

Aus dem Medizinischen Zentrum für Operative Medizin
der Phillips – Universität Marburg
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. P. Griss)
Institut für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik
(Leiter: Prof. Dr. D.B. Jones Ph.D.M.I.Biol)

**Die Mitogen Aktivierten Protein – Kinasen
ERK1 und ERK2
als Bestandteil der Mechanotransduktion
in Primären Bovinen Osteoblasten**

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

Dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps – Universität Marburg

vorgelegt von
Jürgen Egid Leitsch
aus Bad Hersfeld

Marburg 2003

Angenommen vom
Fachbereich Humanmedizin
der
Philipps – Universität Marburg
am

16. Oktober 2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Professor Dr. Maisch

Referent: Professor D.B. Jones Ph.D.M.I.Biol

Korreferent: Prof. Dr. B. Steiniger

Meiner Familie
und meinem geliebten Großvater,
der am Tag der Beendigung dieser Arbeit verstarb

1. Inhaltsverzeichnis

1.	INHALTSVERZEICHNIS.....	1
2.	EINLEITUNG.....	4
2.1	DER KNOCHEN.....	5
2.2	DIE ZELLEN DES KNOCHENS.....	6
2.2.1	Der Osteoklast.....	6
2.2.2	Der Osteoblast.....	7
2.2.2.1	Parathormon.....	9
2.2.2.2	Vitamin D ₃	10
2.2.3	Lining Zellen und Osteozyten.....	10
2.3	DER KNOCHENUMBAUPROZEß.....	10
2.4	MECHANOTRANSDUKTION UND MECHANOSENSIBLE OSTEOBLASTEN.....	14
2.4.1	„strain-related potentials“	16
2.4.2	Ionenkanäle.....	16
2.4.3	Zytoskelett.....	17
2.5	DIE MAP-KINASEN SIGNALKASKADEN.....	19
2.5.1	Die „extracellular signal-regulated kinase“ (ERK) – Kaskade.....	21
2.5.1.1	Ras.....	21
2.5.1.2	Raf.....	22
2.5.1.3	MEK.....	22
2.5.1.4	MAP-Kinase.....	23
2.5.2	Die „stress activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase“ (SAPK/JNK) – Kaskade.....	25
2.5.3	Die p38 MAPK/RK/HOG – Kaskade.....	25
2.6	DER JAK-STAT-WEG.....	27
2.7	WEITERE SIGNALMOLEKÜLE.....	28
2.7.1	Phospholipase C.....	28
2.7.2	Proteinkinase C.....	30
2.8	DER EFFEKT VON SCHWERELOSIGKEIT AUF DIE MECHANO- TRANSDUKTION IN OSTEOBLASTEN.....	32
2.9	„OSTEOBLAST LIKE CELLS“.....	33
2.10	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	34
3.	MATERIAL UND METHODEN.....	36
3.1	MATERIAL.....	36
3.1.1	Chemikalien.....	36
3.1.2	Lösungen und Puffer.....	36
3.1.3	Primärzellen und Zelllinien.....	37
3.1.4	Antikörper.....	37

3.1.5	Aktivatoren.....	37
3.1.6	Inhibitor.....	37
3.1.7	Nährmedien.....	38
3.1.8	Geräte und verwendete Materialien.....	38
3.2	DIE ZELLEN UND ZELLKULTUR.....	39
3.2.1	Präparation primärer boviner Osteoblasten.....	39
3.2.2	Zellkultur.....	39
3.2.3	Ablösen, Einfrieren und Aussetzen der Zellen.....	40
3.2.4	Lysieren der Zellen.....	42
3.3	DEHNUNGSEXPERIMENTE.....	43
3.3.1	Prinzip der Dehnungsexperimente.....	43
3.3.2	Die Vier-Punkt-Dehnungsmaschine.....	43
3.3.3	Aufbau der Polykarbonatplatten.....	45
3.3.4	MTT-Zellproliferationsassay.....	46
3.4	GELELEKTROPHORESE UND IMMUNOBLOT.....	48
3.4.1	Bradford-Protein-Assay.....	48
3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	49
3.4.2.1	Grundlagen.....	49
3.4.2.2	Herstellen des Sammel- und des Trenngels.....	51
3.4.2.3	Elektrophorese.....	52
3.4.2.4	Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Trägermembranen (Westernblot).....	53
3.5	IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS DER MAP-KINASEN.....	54
3.5.1	Grundlagen.....	54
3.5.2	Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen.....	55
3.5.3	Primärantikörper.....	55
3.5.4	Sekundärantikörper.....	56
3.5.5	Colorimetrischer Nachweis der Alkalischen Phosphatase.....	56
3.6	MEK-INHIBITOR.....	57
3.7	PARABELFLUG.....	58
4.	ERGEBNISSE.....	61
4.1	SCHEMA DES ARBEITSABLAUFES.....	61
4.2	MTT-ZELLPROLIFERATIONSASSAY.....	62
4.2.1	Versuchsbeschreibung MTT-Test.....	62
4.2.2	Ergebnisse.....	62
4.3	STIMULIERUNG DER MAP-KINASEN ERK1 UND ERK2 DURCH MECHANISCHE BELASTUNG.....	64
4.3.1	Versuchsbeschreibung.....	64
4.3.2	Ergebnisse Dehnung.....	66
4.3.2.1	SDS-PAGE 10%ig (Coomassie-Färbung).....	66
4.3.2.2	Immunoblot.....	67

4.4	EINMALIGE BELASTUNG AKTIVIERT MAP-KINASEN.....	68
4.4.1	<i>Versuchsbeschreibung.....</i>	68
4.4.2	<i>Ergebnisse Dehnungszyklen.....</i>	69
4.4.2.1	SDS-PAGE 10%ig (Coomassie-Färbung).....	69
4.4.2.2	Immunoblot.....	70
4.5	MEK-INHIBITOR PD98059 VERHINDERT AKTIVIERUNG DER MAP-KINASEN.....	71
4.5.1	<i>Versuchsbeschreibung.....</i>	71
4.5.2	<i>Ergebnisse MEK-Inhibitor.....</i>	73
4.5.2.1	MEK-Inhibitor Verdünnungs-Vorversuch.....	73
4.5.2.2	MEK-Inhibitor-Experiment – SDS 10%ig.....	74
4.5.2.3	Immunoblot.....	74
4.6	EINFLUß DER SCHWERELOSIGKEIT AUF MAP-KINASEN.....	75
4.6.1	<i>Versuchsbeschreibung.....</i>	75
4.6.2	<i>Ergebnisse Schwereelosigkeit.....</i>	76
4.6.2.1	SDS-PAGE 10%ig.....	76
4.6.2.2	Immunoblot.....	79
4.7	ERGEBNISZUSAMMENFASSUNG.....	82
5.	DISKUSSION.....	83
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	98
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	100
8.	ANHANG.....	109
	CURRICULUM VITAE.....	109
	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	111
	Danksagung.....	112
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	113

2. Einleitung

Ein wesentlicher Bestandteil des Lebens ist Kommunikation, Interaktion und Reaktion auf äußere Einflüsse. Auch auf zellulärer Ebene, einem komplexen Netzwerk biochemischer Prozesse, findet eine ständige inter- und intrazelluläre Kommunikation statt. Diese ist zwischen den einzelnen Zellen eines Zellverbandes, eines Gewebes oder sogar eines Organismus zwingend erforderlich, um eine geordnete, zielgerichtete Reaktion gewährleisten zu können und um ein Chaos zu verhindern. Sie ermöglicht die notwendige Anpassung an veränderte Umweltbedingungen ebenso wie die Regulation der Biosynthese, den Abbau und die energetische Verwertung von Metaboliten und Makromolekülen. Hierzu registrieren die Zellen extrazelluläre Signale in Form von physikalischen oder chemischen Reizen. Diese modifizieren sie in intrazellulären Signalketten und setzen sie in eine biochemische Antwort um, welche in der Änderung von Enzymaktivitäten oder der Genexpression mündet. Sie besitzen die Fähigkeit, diese Signale an andere Zellen weiterzuleiten (Krauss, 1997). Wie nun eine Zelle mit ihrer Umwelt kommuniziert und nach welchen Mechanismen sie extrazelluläre Signale verarbeitet, ist Gegenstand des Gebietes der Signaltransduktion. Ein Teilgebiet hiervon ist die Mechanotransduktion, die Frage nach den beteiligten Strukturen und Signalketten einer Zelle vom auslösenden Signal in Form einer mechanischen Belastung (Dehnung, Druck, Scheerkräfte, Schwerelosigkeit, etc.) bis hin zur biochemischen Reaktion.

Zahlreiche Krankheiten des Menschen sind mit Störungen zellulärer Regulationsprozesse sowie einer gestörten Signalverarbeitung verbunden. So ist bekannt, dass eine Minderbelastung des Knochens, sei es durch Immobilisation oder Schwerelosigkeit zu einer Verringerung der Knochendichte und damit der Stabilität führt (Osteopenie/Osteoporose), eine gezielte Mehrbelastung demgegenüber eine Zunahme der Knochendichte verursacht, oder zumindest die Abnahme verhindert (Smith and Raab, 1986). Eine unphysiologisch hohe Belastung des Knochens, resp. der Osteoblasten, führt allerdings sowohl in vivo als auch in vitro zu

einer Abnahme der Knochendichte und kann in eine Entzündung des Gewebes münden (Jones et al., 1995).

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, mechanosensible Osteoblasten hinsichtlich der an der Mechanotransduktion beteiligten Stoffwechselkaskaden und Signalproteine zu erforschen. Hierdurch sollen neue Hinweise auf mögliche zellbiologische Mechanismen gewonnen werden, die verantwortlich für die Umwandlung einer mechanischen Belastung in eine biologische Reaktion der Knochenzellen sind, um schließlich so dem mechanotransduktorisches Mechanismus der Zellen näher zu kommen.

2.1 Der Knochen

Der Knochen ist ein komplexes Organ aus Knochen-, Knorpel-, fibrösem- und blutbildendem Gewebe. Bei der Entwicklung des Knochens müssen diese vier Gewebe zusammenwirken. Ein Charakteristikum des Knochens ist seine außergewöhnliche Fähigkeit für Wachstum, dauernden Umbau und Regeneration im postnatalen Leben (Mayer et al., 1992). Bereits 1892 postulierte der Berliner Chirurg Julius Wolff in seinem Buch *„Das Gesetz der Transformation der Knochen“* einen trajektoriellen Aufbau des Knochens, welcher durch die mechanische Belastung mitbestimmt wird und mathematisch beschrieben werden kann (Wolff, 1892). Wilhelm Roux erkannte 1881, dass für die Adaption des Knochens an seine mechanische Umgebung nicht nur die Statik die Form und die Funktion des Knochens bestimmt, sondern dass auch eine Resorption des Knochens für die vorhandene Dynamik verantwortlich ist (Dibbets, 1992; Roux, 1881a; Roux, 1881b). Die den Knochen modellierenden Kräfte sind aufeinander abgestimmt, um den Grundbedürfnissen des Knochengewebes unter den Bedingungen von Entwicklung, Wachstum, Substanzerhaltung, Reparation und Altern zu genügen (Burkhardt, 1992).

Der Knochen gehört mit seiner beachtlichen Stabilität und Bruchfestigkeit zu den härtesten Substanzen des menschlichen Körpers, ohne jedoch eine notwendige Elastizität einzubüßen. Seine Funktionen sind vielfältig.

Er dient als mechanische Stütze, als Muskelansatz, als Schutz innerer Organe, als Reservoir für Mineralsalze und der Bewegung. Er besteht zu ca. 15% aus zellulären Bestandteilen, zu ca. 40% aus organischer Matrix und zu ca. 45% aus anorganischer mineralischer Phase. Die organische Knochensubstanz wird zu 95% durch das Kollagen Typ I repräsentiert und zu 5% durch nichtkollagene Proteine (Osteokalzin, Osteonektin, Knochenproteoglykan, Sialoprotein, morphogenetisches Protein, Proteolipid). Das Kollagen wird nach dem Wolff'schen Gesetz entlang biomechanischer Kraftlinien abgelagert und wird zeitlebens seiner Funktion strukturell angepasst. Das Osteoid (nichtmineralisiertes Kollagen) bildet das Kristallisationszentrum für den Knochen. Hydroxylapatit nimmt mit ca. 90% den größten Anteil an der anorganischen Phase des Knochens ein. Fluorapatit, Carbonatapatit, Kalziumkarbonat und Magnesiumkarbonat stellen die restlichen 10% des anorganischen Anteils (Buddecke, 1981) (Felsenberg, 2001).

2.2 Die Zellen des Knochens

Vier Zellgruppen sind für die normale Funktion des Knochens verantwortlich. Der **Osteoblast** ist für die Bildung neuer Knochensubstanz verantwortlich, sein Kontrahent, der **Osteoklast**, baut Knochensubstanz ab, **Osteozyt** und **Liningzelle** sorgen für Stabilität und Funktion sowohl des Mineralspeichers als auch des Strukturelementes Knochen (Abendroth, 1992).

2.2.1 Der Osteoklast

Osteoklasten sind knochenresorbierende vielkernige Riesenzellen, die durch Fusion mononukleärer hämatopoetischer Stammzellen der Monozyten/Makrophagenlinie entstehen. Durch aktive Sekretion saurer Phosphatase kommt es zum Anlösen der Hydroxylapatitkristalle. Häufig liegen Osteoklasten in den von ihnen gebildeten Lakunen, den sog. *Howshipschen Lakunen*. Sie sind reich an Mitochondrien und Vakuolen, RNA, Proteoglykanen, tartratresistenter saurer Phosphatase und weiteren Enzymen. Ihre Differenzierung, Proliferation, Fusion, Aktivität und ihr Überleben (Apoptose) ist unmittelbar mit den Osteoblasten verbunden und

von diesen abhängig (s. 2.3 „bone remodeling“) (Katagiri and Takahashi, 2002).

2.2.2 Der Osteoblast

Der *Osteoblast* entwickelt sich aus einer pluripotenten fibroblastoiden Stammzelle des Knochenmarkes, aus der sich neben den osteoblastischen Zellen für den Aufbau des Knochens noch Fibroblasten und Fibrozyten als Faserproduzenten, Adipozyten als Fettstrukturspeicher und retikuläre Zellen für den Strukturaufbau des Markstromas ableiten können (Abendroth, 1992). Auf dem Weg zum reifen Osteoblasten durchlaufen die Zellen das Stadium der experimentell nachgewiesenen sog. *induzierbaren osteoprogenitor Zellen* (IOPC's) oder das der *determinierten osteoprogenitor Zellen* (DOPC's). Diese besitzen das Potential, sich entweder mittelbar durch heterogene Agentien induziert (IOPC's) oder unmittelbar (DOPC's) in Prä-Osteoblasten und dann in Osteoblasten zu differenzieren, um schließlich Knochenmatrix bilden zu können. Osteoblasten sind kuboide Zellen; sie stehen durch einfache Anlagerung oder durch spezielle Membranöffnungen (gap- bzw. adherens junctions) in engem Kontakt zueinander. Gap-junctions verbinden sie mit den Osteozyten zu einem „*funktionellen Synzythium*“. Sie liegen aufgereiht auf der Knochenoberfläche mit einem Durchmesser von ca. 20-30µm, haben runde Kerne mit 1-3 Nukleoli und in Abhängigkeit ihres Aktivierungsgrades einen mehr oder weniger deutlich strukturierten Golgi-Apparat (Burkhardt, 1992).

Hauptfunktionen des Osteoblasten sind die Produktion und die Mineralisation von lamellären Knochen einerseits, sowie die Lysis von Matrixproteinen und die Attraktion und Aktivierung von Osteoklasten zur Steuerung des „Bone remodeling“ andererseits (Burkhardt, 1992) (Schoppet et al., 2002). Ihre Syntheseleistung umfaßt u.a.:

- Kollagen Typ I
- alkalische, knochenspezifische Phosphatase
- Matrixproteine (u.a. Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin)
- Proteoglykane

- Matrixvesikel
- Glykogen
- Calciumapatit
- organische Phosphate
- Prostaglandine
- Prostazyklin
- Granulozyten-Makrophagenkolonie stimulierender Faktor (GM-CSF)
- Plasminogenaktivator
- Osteoprotegerin (OPG)
- „receptor activator of nuclear factor (NF-KappaB) – ligand“ (RANKL)

Das intrazelluläre Prä-Kollagen Typ I polymerisiert extrazellulär zu den reifen Kollagenfibrillen. In dieses Gerüst werden die membranartig umschlossenen Kristallformationen (=Matrixvesikel) nach Ausschleusung aus dem Osteoblasten unter Mitwirkung der Matrixproteine *Osteocalcin* und *Osteonectin* eingebaut. Der reife Osteoblast erweist sich als stoffwechselaktive Zelle, deren Sauerstoffverbrauch über dem der Knochenmarkzelle liegt. Seine aktive Lebensspanne wird auf 3 Tage bis zu einigen Wochen geschätzt (Abendroth, 1992; Mayer et al., 1992). Eine Vielzahl nachgewiesener Rezeptoren lassen eine fein steuerbare endo- und parakrine Stoffwechselregulation erahnen. Zu nennen sind hier Rezeptoren für:

- das Parathormon
- das Vitamin D₃
- die Retinoide
- die Östrogene
- die Progesterone
- die Androgene
- die Glukokorticoide
- die Schilddrüsenhormone
- und die Wachstumshormone.

Des weiteren spielen für die Osteoblastenfunktionen eine Reihe von Peptiden eine wichtige Rolle, die - lokal aktiviert - als Wachstumsfaktoren bezeichnet werden (Abendroth, 1992). Die wichtigsten sind:

- der Insulin like growth factor (IGF)
- der Epidermis growth factor (EGF)
- der Transforming growth factor alpha ($TGF\alpha$)
- der Transforming growth factor beta ($TGF\beta$)
- und der Platelet-derived growth factor (PDGF).

Hormone und Wachstumsfaktoren zeigen knochenresorbierende und/oder knochenaufbauende Wirkung. Ein bestimmter Faktor kann eine knochenresorbierende Wirkung haben, indem er direkt oder indirekt knochenabbauende Zellen aktiviert. Weiter kann ein bestimmter Faktor eine knochenaufbauende Wirkung haben, wobei er knochenabbauende Zellen inaktiviert und/oder knochenaufbauende Zellen aktiviert.

Für diese Ambivalenz gelten das **Parathormon (PTH)** und das **Vitamin D₃** als klassische Beispiele, als die wichtigsten Regulatoren der Calciumhomöostase (Reichel, 1992).

2.2.2.1 Parathormon

PTH führt über die Osteoblasten zu einer Aktivierung der Osteoklasten und damit zu einer Calciummobilisierung. Auch anabole Wirkungen wie die Steigerung der Proliferation von Osteoblasten und Chondrozyten und knochenaufbauende Wirkungen sind dokumentiert (Mayer et al., 1992). Vermittelt wird dies über drei unterschiedliche second messenger Systeme in den Zielzellen, die *Adenylatcyclase*, den cytosolischen Anstieg von Ca^{2+} und die Freisetzung von *Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP₃)*, was letztendlich zu einer Zunahme der Zellgröße, zu einer Ausprägung von Nukleoli und zu einer Steigerung der Produktion von Peptidasen, Kollagenase und Plasminogenaktivator-Inhibitor führt. Wahrscheinlich beeinflusst dieses Hormon auch die Differenzierungsvorgänge auf dem Weg zum reifen Osteoblasten (Mayer et al., 1992).

2.2.2.2 Vitamin D₃

Der biologisch aktive *Vitamin D₃-Metabolit 1 α ,25 Dihydroxy-cholecalciferol* (1,25(OH)₂D₃) steigert die Aktivität der Osteoblasten im Sinne einer zunehmenden Differenzierung der Zelle mit anabolen und katabolen Effekten. Es kommt zu einer Reduktion der Kollagen Typ I-Synthese, zu einer vermehrten Aktivierung der Alkalischen Phosphatase, zur Steigerung der IGF-I-Rezeptoren-Expression und zu weiteren Genbeeinflussungen in nahezu allen Geweben (Mayer et al., 1992). In Abhängigkeit der Dosis dominiert experimentell die anabole (niedrige Dosen) oder die katabole Wirkung (Abendroth, 1992).

2.2.3 Lining Zellen und Osteozyten

Die an der Osteoidoberfläche anliegenden **Lining Zellen** sind höchstwahrscheinlich identisch mit ruhenden Osteoblasten (resting cells); sie unterscheiden sich von den aktiven Formen durch eine geringere Enzymausstattung und die membrana limitans, welche die Osteoidoberfläche bedeckt (Burkhardt, 1992). Ihnen wird eine zentrale Rolle beim Auf- und Abbau der Knochenmatrix zugesprochen. Sie stehen mit den **Osteozyten** in fester regulativer Verbindung. Diese stammen ebenfalls von den Osteoblasten ab und befinden sich in der Tiefe der gebildeten Knochenmatrix, können allerdings bei Bedarf die Matrixproduktion wieder aufnehmen.

2.3 Der Knochenumbauprozess (Bone remodeling)

Die Knochenmasse des ausgewachsenen Skeletts bleibt unter physiologischen Bedingungen während der Knochenumbauphase konstant. Bone remodeling beinhaltet die Resorption vorhandenen Knochens durch die Osteoklasten, gefolgt von Knochenneubildung durch die Osteoblasten. Dies führt unter Normalbedingungen zu einem dynamischen Gleichgewicht mit Erhalt der strukturellen Integrität des Knochengewebes. Lange ging man davon aus, dass der Knochenumbau von den Osteoklasten initiiert werden würde. Weitere Forschungen zeigten

jedoch, dass Zellen der Osteoblasten-Linie direkten Einfluß auf die Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten nehmen und so den Umbauprozess mitsteuern (Corral et al., 1998). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Osteoklasten keine Rezeptoren für die wichtigsten, den Knochenstoffwechsel regulierenden Hormone (PTH und Calcitriol/Vit D₃) aufweisen, wohl aber die Osteoblasten, als die unmittelbaren Empfänger dieser hormonalen Signale (Burkhardt, 1992; Lilienfeld, 1992).

Erst vor wenigen Jahren (1997) wurde von zwei unabhängigen Forschungsgruppen diesbezüglich eine bahnbrechende Entdeckung gemacht (Simonet et al., 1997; Tsuda et al., 1997). Sie wiesen ein neues Cytokin-System nach, welches die lang vermutete Verbindung zwischen Osteoblasten und deren steuernden Einfluß auf die Osteoklasten bestätigte. Es beinhaltet den „Receptor activator of nuclear faktor (NF-KappaB) – ligand“ (RANKL), den „Receptor activator of NF-Kappa B“ (RANK), sowie den „decoy receptor osteoprotegerin“ (OPG). Osteoblasten exprimieren RANKL als einen membranassoziierten Faktor. Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimieren den entsprechenden Rezeptor RANK an ihrer Membranoberfläche. Durch Zell-Zell-Kontakte und damit Ligand-Rezeptor-Bindung zwischen Osteoblasten und Osteoklasten-Vorläuferzellen kommt es zu Proliferation, Differenzierung, Fusion und Aktivierung der Osteoklasten (Katagiri and Takahashi, 2002). OPG ist ein, von den Osteoblasten produzierter löslicher „decoy receptor“ für RANKL aus der Gruppe der „Tumor necrosis factor receptor“-Familie. OPG und RANK stehen im Wettstreit um die Bindung von RANKL. Die Bindung von RANKL an OPG führt zu keiner weiteren Signalkaskadenaktivierung, im Sinne eines neutralisierenden kompetitiven Rezeptorantagonisten (Schoppet et al., 2002) (Hofbauer and Heufelder, 2001) (Kostenuik and Shalhoub, 2001). RANKL ist folglich der lang geforderte Schlüsselmediator der Osteoklastogenese.

Die Sekretion von OPG und RANKL wird durch eine Vielzahl von Hormonen (u.a. PTH, Vit D₃, Glucocorticoide, Östrogene), von Cytokinen (u.a. TNF α , Interleukine) und durch verschiedene mesenchymale Transkriptionsfaktoren reguliert (Hofbauer and Heufelder, 2001). Viele der

calcitropen Hormone und Cytokine, einschließlich Parathormon, Vit D₃ und Interleukin 11 wirken auf zweifachem Weg. Zum einen inhibieren sie die Produktion von OPG, zum anderen stimulieren sie die Produktion von RANKL (Aubin and Bonnelye, 2000;Fu et al., 2002). Im Gegensatz dazu verhindern Östrogene die Bildung von RANKL und damit die durch RANKL stimulierte Osteoklastogenese (Rosa-Ranal et al., 2001). Das Verhältnis von OPG zu RANKL bestimmt das Ausmaß der Knochenresorption. Ein Überangebot von RANKL erhöht die Resorption, ein Überwiegen des OPG verhindert die Resorption (Kostenuik and Shalhoub, 2001).

Dieses Wissen des RANK/RANKL/OPG-Systems und der damit verbundene Erkenntniszuwachs der Osteoklastendifferenzierung und –aktivierung ist ein großer Fortschritt auf dem Gebiet des Knochenstoffwechsels mit vielversprechenden neuen Therapieansätzen bei Erkrankungen des knochenbildenden Systems, wie z.B. Osteoporose, Osteopetrose, Morbus Paget, Hypercalcämie und auch bei rheumatoider Arthritis (Ueland et al., 2002).

Zu Beginn des Remodelings ist die Knochenoberfläche bedeckt mit den Liningzellen. Nach Aktivierung des Umbauzyklus durch unterschiedlichste lokale oder systemische Faktoren kommt es in den Osteoblasten/Liningzellen zu einer Freisetzung neutraler Kollagenase. Dadurch wird die oberflächliche Kollagenschutzschicht der Knochenmatrix entfernt und das mineralisierte Osteoid freigelegt, woraufhin nun die aktivierten Osteoklasten in die resorptive Phase eintreten können. Sobald diese beendet ist, verlassen die Osteoklasten die Oberfläche. Osteoblasten-Vorläuferzellen bedecken im Anschluß daran die Oberfläche, differenzieren in Osteoblasten/Liningzellen und produzieren Knochenmatrix (McKee and Nanci, 1995).

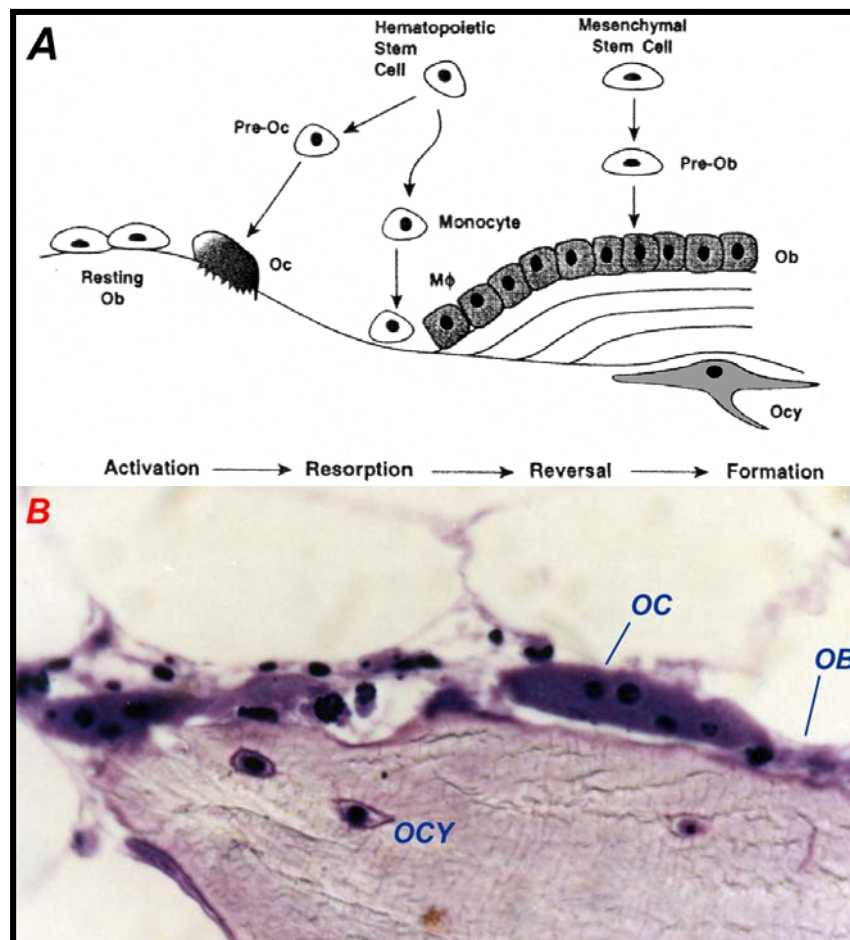


Abb. 2.1 „Bone remodeling“

- (A) Die Osteoblasten (Ob) differenzieren aus mesenchymalen Stammzellen, die ebenso auch zu Muskel-, Fett- und Knochenzellen differenzieren können. Die Differenzierung verläuft über eine Reihe von Reifungsschritten, welche durch eine sequentielle Expression sogenannter Osteoblastenmarker gekennzeichnet sind. In ihre eigene Matrix (=Osteoid) eingebettet, wandeln sie sich zu Osteozyten (Ocy). Osteoklasten entstammen hämatopoetischer Stammzellen. Auch sie durchlaufen einen Reifungsprozeß hin zum resorbierenden Osteoklasten. Die entstehenden Lakunen werden von Osteoblasten ausgekleidet, welche dann mit der Synthese von neuem Knochenmaterial beginnen. Aus:(Duncan et al., 1998)
- (B) Histologisches Präparat (Toluidinfärbung, 630xVergrößerung) eines Trabekelabschnittes. Zu erkennen sind multinukleäre Osteoklasten (Oc), die an der Knochenoberfläche adhärieren. Osteoblasten (Ob) bedecken ebenfalls die Oberfläche. In der Knochenmatrix erkennt man eingebettete Osteocyten (Ocy). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von D.B. Jones, M. Kratz (Exp. Orthopädie & Biomechanik, Univ. Marburg).

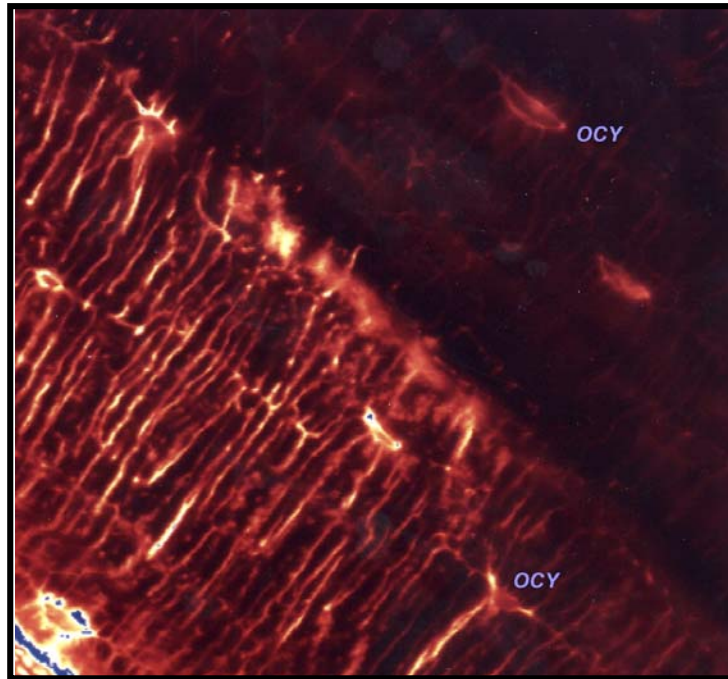


Abb.2.2: Präparat einer Imprägnierung der Kompakta mit einer Rhodamin B versetzten Trägersubstanz, angefertigt nach der Hochdruckabgußtechnik nach Uchtmann & Wilkie. Zu erkennen sind Osteocyten (OCY), die über Canaliculi miteinander in Verbindung stehen. Zur Verfügung gestellt von Dr. H. Uchtmann, Physiologische Chemie d. Univ. Marburg und D.B. Jones, Exp. Orthopädie & Biomechanik, Univ. Marburg

2.4 Mechanotransduktion und mechanosensible Osteoblasten

Die Gewebe des Körpers bilden sich nach dem ökonomischen Prinzip. Bildet sich mehr Gewebe, als es die Bedingungen erfordern, ist es Verschwendung; bildet sich zu wenig, können die Anforderung an das Gewebe nicht erfüllt werden. Anhand von Muskelgewebe kann dies leicht nachvollzogen werden. Bei Minderbeanspruchung kommt es zu Muskelatrophie, bei stärkerer Beanspruchung ist eine Hypertrophie die Reaktion des Gewebes auf die Belastung. Hierfür benötigen die Zellen ein empfindliches System mit Rückkopplungsmechanismen, um ein optimal funktionierendes Gewebe zwischen Auf- und Abbau bewahren zu können, den „Mechanosensor“. Die physiologische Belastung der Knochenzellen ist weitaus geringer als die anderer Zellarten (so werden beispielsweise Lungenepithelien bis zu 50%, Muskel- und Hautzellen physiologisch sogar bis zu 120% gedehnt). Während normaler Belastungen wird der Knochen um nur ca. 0,4% gedehnt, das bedeutet, dass die erforderliche Sensitivität

an den hypothetischen Mechanosensor der Knochenzellen enorm hoch ist, vergleichbar mit der des Hörorgans (Jones et al., 1995).

Um die experimentell ausgeübte Belastung/Dehnung vereinheitlicht quantifizieren zu können, einigte man sich auf die dimensionslose Einheit „Strain“. Strain (S) ist definiert als die Längenänderung (neue Länge abzüglich der Originallänge) dividiert durch die Originallänge).

$$S(\varepsilon) = (l' - l) / l$$

1 Strain entspricht einer Verdopplung der Länge, eine Dehnung um beispielsweise 0,4 % entspricht $4000\mu\varepsilon$.

1972 untersuchte erstmals Lanyon die bei physiologischen Bewegungen auftretenden biomechanischen Kräfte an Brustwirbeln von Schafen in vivo. Er fand heraus, dass die auftretenden Belastungen maximal $3000\mu\varepsilon$ betragen (Lanyon, 1972). In darauf folgenden Studien untersuchte er die zur Knochensubstanzerhaltung notwendige minimale Belastung sowie den Einfluß von höheren Belastungen. Er fand heraus, dass es bei einer Belastung von weniger als $500\mu\varepsilon$ zu einer Atrophie der knöchernen Substanz, im Bereich von $500-1500\mu\varepsilon$ zu einem status quo und bei Belastungen über $1500\mu\varepsilon$ zu einer Zunahme der Knochensubstanz kam. Des weiteren belegte er den Einfluß von Frequenz und Anzahl der Belastungszyklen auf den Knochen (Lanyon, 1984; Lanyon et al., 1986). Im hyperphysiologischen Bereich von mehr als $5000\mu\varepsilon$ verhält sich der Knochen nicht mehr elastisch, es kommt zu Mikrofrakturen. Eine Belastung über $10000\mu\varepsilon$ führt zu einer Dedifferenzierung der Osteoblasten in fibroblastenähnliche Zellen (Jones et al., 1991).

Dass Osteoblasten mechanosensible Zellen sind, wurde in der Vergangenheit in vielen Experimenten eindeutig belegt. Die auf eine mechanische Belastung folgende Aktivierung der Osteoblasten führt u.a. zu einer Zunahme der Cortikalisdicke, Zunahme der Anzahl und der Dicke der Trabekel, Steigerung der Knochenmineralisierung und zu einer

Veränderung der Proteoglykane, um so den aktuellen Anforderungen der Umgebung gerecht zu werden (Wolff's Law) (Skerry et al., 1990). Seit Jahren wird intensiv an „dem Mechanosensor“ der Osteoblasten geforscht, bisher konnte jedoch noch nicht definitiv nachgewiesen werden, auf welche Art und Weise ein mechanischer Stimulus von der Zelle in eine biomechanische Antwort umgesetzt wird. Eine Reihe von Hypothesen wurden aufgestellt. Im folgenden werden die zur Zeit diskutierten Hypothesen im Überblick kurz dargestellt:

2.4.1 „strain-related potentials“ (SRP)

1964 veröffentlichte Bassett die Theorie, dass die bei Belastungen des Knochens auftretenden elektrischen Ströme (Piezoelektrizität) als physiologische Signale fungieren und so die Zellaktivität steuern (BASSETT C.A.L. et al., 1964). Einige Artikel schienen in der Folgezeit diese Theorie der strömenden Potentiale zu bestätigen. Jedoch bewies Lanyon 1979 in experimentellen Studien am Radius eines Schafes, dass nicht alle physiologischen Effekte damit erklärt werden könnten. Er bezweifelte, dass die tatsächlich auftretenden Belastungsfrequenzen und –amplituden Potentiale in einem ausreichenden Ausmaß hervorrufen können (Lanyon et al., 1979). Obwohl man weiß, dass schwache elektrische Felder Galvanotaxis induzieren (Poo and Robinson, 1977) und Einfluß auf die Zellausrichtung nehmen (Harris et al., 1990), geht man heutzutage allenfalls von einem sehr schwachen Zusammenhang zwischen mechanischer Belastung und elektrischen Signalen aus.

2.4.2 Ionenkanäle

1984 wiesen Guharay und Sachs mechanosensible K^+ -Kanäle in Muskelzellen nach (Guharay and Sachs, 1984), später wurden von anderen Forschern weitere mechanosensible K^+ -Kanäle beschrieben. 1989 beschrieben Duncan und Misler mechanosensible Ca^{2+} -Kanäle (Duncan and Misler, 1989) und 1990 Davidson mechanosensible K^+ -Kanäle in Osteoblasten (Davidson et al., 1990). Jones und Bingman kamen 1991 aufgrund experimenteller Ergebnisse zu der Überzeugung, dass es in mechanisch belasteten Osteoblasten zuerst zu einer

Aktivierung der Kalium-Kanäle, gefolgt von einer Aktivierung der Calcium-Kanäle kommt (Jones and Bingmann, 1991). Ob allerdings die Aktivierung der Ionenkanäle eine direkte Folge des mechanischen Einflusses ist, z.B. durch eine Verbindung einer hypothetischen mechanosensiblen Struktur mit dem Ionenkanal, oder ob sie indirekt Folge einer vorher ablaufenden Aktivierungskaskade ist, ist ebenfalls noch nicht endgültig geklärt. Versuchsergebnisse von Jones sprechen allerdings für eine indirekte Aktivierung der Ionenkanäle, da er nachweisen konnte, dass es erst nach einem Anstieg des intrazellulären freien Calciums (IFC) zu einem Anstieg des Membranpotentials durch Öffnung der Ionenkanäle kommt (Jones and Bingmann, 1991).

2.4.3 Zytoskelett

Die Zellform resultiert aus dem Zusammenspiel der kontraktile Kräfte der Mikrofilamente und den kompressions-widerstehenden Mikrotubuli der Zelle. Unter dem Einfluß externer Krafteinwirkung kommt es zu einer Veränderung dieser Zellform. Eine Voraussetzung an den Mechanosensor ist laut Watson eine funktionelle Assoziation mit dem intakten Cytoskelett, wahrscheinlich über Aktinmikrofilamente, welche die auf die Zelloberfläche einwirkenden Kräfte auf den Sensormechanismus fokussieren (Watson, 1991). 1995 gelang es ihm dies, durch Desintegration des Actin-Cytoskelettes mit Cytochalasin D, zu beweisen. Die damit behandelten Zellen waren insensitiv bezüglich der Akkumulation von cAMP nach mechanischer Belastung (Watson et al., 1995). Vergleichbare Ergebnisse lieferten Jones und Bingmann bereits 1991, indem sie feststellten, dass es nach einer 10-20 minütigen Dauerbelastung zu einer Depolarisierung von Aktinfilamenten und einer damit korrelierenden fehlenden IFC Ausschüttung nach mechanischer Belastung kommt (Jones and Bingmann, 1991).

Ingber vermutete 1991, dass **Integrine** die Verbindung der extrazellulären Matrix, bestehend aus u.a. Fibronectin, Vitronectin, Laminin und Kollagen, mit dem Zytoskelett darstellen und damit verantwortlich für die Mechanotransduktion seien. Integrine sind heterodimere Transmembranproteine, die eine Verbindung zu den Matrixproteinen herstellen. Sie

werden als funktionelle, mechanochemische Transduktionsproteine in Betracht gezogen (Ingber, 1991). Aarden wies Interaktionen der extrazellulären Matrix mit den Integrinen in Hühnchen-Osteoblasten in vitro nach, indem diese die Aktivität und Differenzierung der Osteoblasten vermitteln (Aarden et al., 1996). Sie induzieren die transmembranöse Anordnung von multimolekularen Komplexen aus mehr als 30 Cytoskelett- und Signalproteinen. Dadurch regulieren sie eine Vielzahl nachgeschalteter Prozesse, wie z.B. die Aktivität der Transkriptionsfaktoren, Induktion von mehr als 30 Genen und die Expression von mehr als 100 Proteinen (Miyamoto et al., 1998); vermutlich wird dies erreicht durch eine Integrin-vermittelte Aktivierung einiger intrazellulärer Signalwege wie z.B. Tyrosin-Phosphorylierungskaskaden, MAP-Kinasen Aktivierung (mitogen aktivierte protein – Kinase), Calziumeinstrom, Ras/Raf-, ERK- und JNK-Aktivierung sowie Phosphoinositol-turnover (Miyamoto et al., 1995).

Gegenwärtig sind 16 Integrin α - und 8 Integrin β -Untereinheiten identifiziert, welche zu ca. 20 unterschiedlichen Rezeptoren kombiniert werden können. So ist beispielsweise das $\alpha_5\beta_1$ – Integrin ein Rezeptor für Fibronectin. Über diese Rezeptor-Matrix-Kontakte werden möglicherweise die o.g. Stoffwechselwege gesteuert (Cary et al., 1999). Cary beschreibt eine Aktivierung der „**Focal adhesion kinase**“ (FAK) durch Integrine. Aktivierte FAK ist eine Tyrosinkinase, die an Fokalkontakten lokalisiert ist und mit Cytoskelett- und Signalproteinen interagiert. Er sieht daher FAK als molekulare Verbindung von Integrinen und Ras, welches wiederum weitere Signalproteine reguliert, z.B. ERK (s.u.) (Cary et al., 1999).

Jones versuchte, die Hypothesen des mechanosensiblen Cytoskelettes mit den Beobachtungen, dass es innerhalb von 160 Millisekunden nach Dehnung von Osteoblasten zu einer Aktivierung der Phospholipase C, verbunden mit einem Anstieg des intrazellulären Calciums kam, zu vereinen. Er vermutete ein hypothetisches Konnektorprotein zwischen PLC und Cytoskelett, welches durch die Belastung disloziert und dadurch eine PLC-Aktivierung hervorruft (Jones and Bingmann, 1991).

Eine Reihe von Stoffwechselwegen, die mit der Mechanosensibilität der Osteoblasten in Zusammenhang stehen, konnten experimentell nachgewiesen werden, doch konnte bisher „der Mechanosensor“ als solcher nicht identifiziert werden, lediglich Erklärungsmodelle für die beobachteten Zellreaktionen wurden aufgestellt. In der Literatur wird eine direkte Beteiligung des Cytoskelettes unter Vermittlung der Integrine und eine nachgeschaltete Aktivierung eines oder mehrerer Second-messenger-Systeme favorisiert (s.u.).

2.5 Die MAP-Kinasen Signalkaskaden

Als Folge externen Einflusses auf eine Zelle (z.B. Hormone, Wachstumsfaktoren, Stress u.a.) wird die Phosphorylierung und Aktivierung von genregulatorischen Proteinen oder von Enzymen beobachtet, die Schlüsselreaktionen des Stoffwechsels katalysieren. Vermutlich sind einige, der bisher bekannten Signalkaskaden, welche die Signale innerhalb der Zellen amplifizieren und weiterleiten auch in die Mechanotransduktion involviert.

In Säugetierzellen sind drei verschiedene MAP-Kinasen-Kaskaden bekannt. Es sind dies:

- die „extracellular signal-regulated kinase“ (ERK) – Kaskade
- die „stress activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase“ (SAPK/JNK) – Kaskade
- die p38MAPK/RK/HOG – Kaskade.

Ziel dieser Stoffwechselwege sind eine teilweise überlappende Regulation von Transkriptionsfaktoren, welche zur Aktivierung von sog. „rapid response genes“, insbesondere der Mitglieder der fos- und jun-Familie der Proto-Onkogenen führt (Hipskind and Bilbe, 1998).

Bei den MAP-Kinasen handelt es sich um sequentiell hintereinandergeschaltete Proteinkinasen, ein sehr flexibles und leistungsfähiges Prinzip, mit dem Signale amplifiziert, diversifiziert und

reguliert werden können. Sie sind so einer Vielzahl regulatorischer Einflüsse zugänglich. Auf jeder Stufe einer Proteinkinase-Kaskade ist eine positive oder negative Regulation möglich. Schlüsselemente dieser Kaskaden sind cytoplasmatische Proteinkinasen, die aufgrund ihrer Regulierbarkeit durch extrazelluläre, häufig mitogen (=zellteilungsfördernd) wirkende Liganden als Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase, MAPK) oder als extrazellulär regulierte Kinase (=ERK) bezeichnet werden.

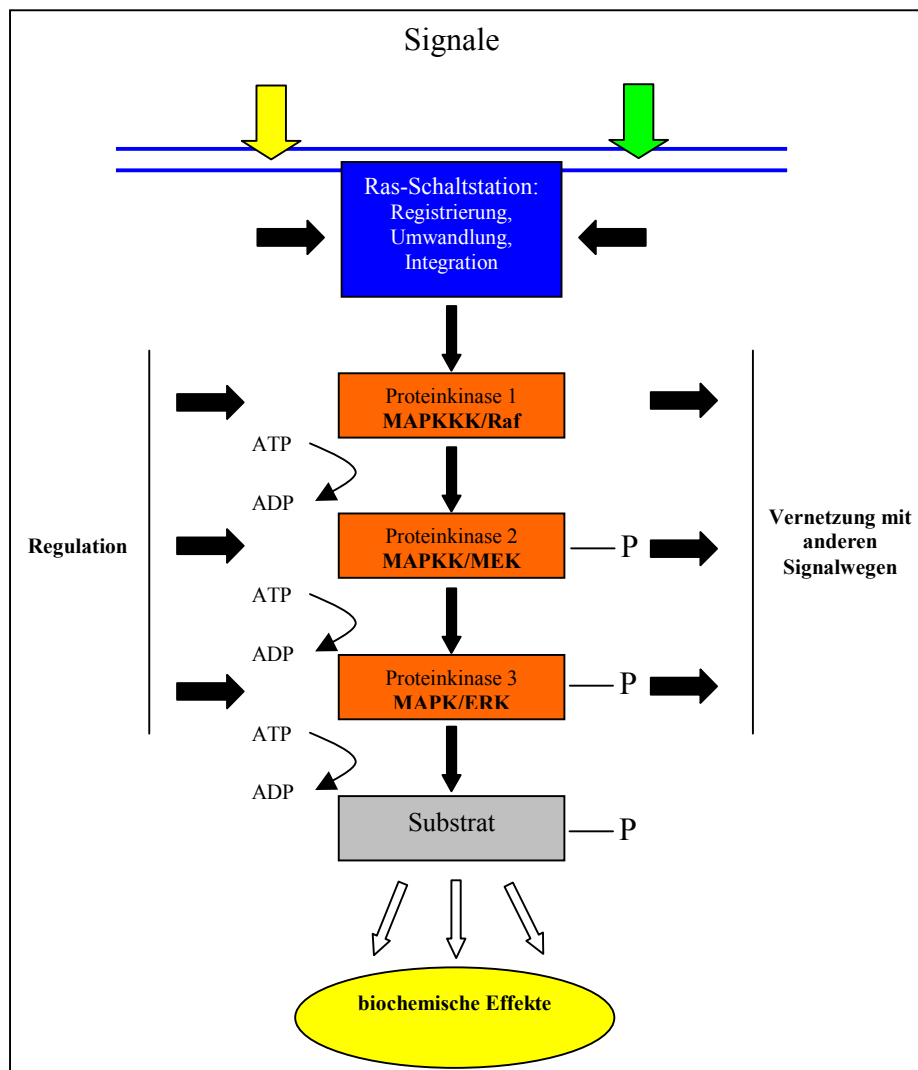


Abb.2.3: Prinzip der Signalübertragung durch intrazelluläre Proteinkinase-Kaskaden. Die intrazellulären Proteinkinase-Kaskaden verarbeiten Signale, die von zentralen Schaltstationen wie dem Ras-Protein an der Innenseite der Zellmembran registriert, integriert und weitergegeben werden. Im Falle des MAP-Kinasen Weges umfaßt die Kaskade mindestens drei verschiedene Proteinkinasen. Auf jeder Ebene der Kaskade können spezifische Regulationsprozesse angreifen, außerdem können von den verschiedenen Proteinkinasen noch Signale an andere Signalwege weitergegeben werden (abgewandelt aus Krauss, Biochemie der Regulation und Signaltransduktion).

2.5.1 Die „extracellular signal - regulated kinase“ (ERK) – Kaskade

Die ERK-Kaskade besteht aus 6 Stufen. Initiiert wird sie durch Ligandenanlagerung an den beteiligten Zellrezeptoren (Seeger and Krebs, 1995). Drei verschiedene Arten von Rezeptoren vermögen die erste Stufe der ERK-Kaskade, die Ras-Proteine, zu aktivieren: Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase, Rezeptor-Tyrosinkinasen und Rezeptoren mit gekoppeltem G-Protein. Experimentell belegt ist die Aktivierung der Kaskade durch Wachstumsfaktoren wie epidermal growth factor (EGF), platelet derived growth factor (PDGF), insulin like growth factor (IGF) und nerve growth factor (NGF) durch Bindung an die Rezeptor-Tyrosinkinase in unterschiedlichsten Zellen (Chaudhary and Avioli, 1998).

2.5.1.1 Ras

Die *Ras-Proteine* sind die am besten erforschten, wachstums-regulierenden Signalproteine. Sie wurden erstmals in durch Retroviren ausgelösten Rattensarkomen (rat sarkoma) nachgewiesen. Anfang der 80er Jahre fand man heraus, dass ca. 30% aller soliden Tumore des Menschen eine Mutation im Ras-Gen aufweisen. Sie sind regulatorische GTPasen, die entweder in einer *inaktiven GDP-* oder in einer *aktiven GTP-Form* vorliegen. Der inaktive Komplex zwischen Ras und GDP ist sehr stabil und dissoziiert nur sehr langsam. Verschiedene Proteine nehmen auf die Aktivierung der Ras-Proteine regulatorischen Einfluß. So beschleunigt der *Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor* (GEF) die Abdissoziation des gebundenen GDP, die *GTPase-aktivierenden Proteine* (GAP) wiederum verkürzen die aktive Phase der Ras-Proteine, indem sie die intrinsische GTPase aktivieren. Die GEFs stellen, zusammen mit *Adaptorproteinen*, die Verbindung zwischen aktivierter Rezeptor-Tyrosinkinase und den Ras-Proteinen her. Bei dem Adaptorprotein der Säugetiere handelt es sich um das *Grb2-Protein* (Grb=growth factor receptor binding protein). Das Grb2-Protein liegt in Form eines festen Komplexes mit dem Nucleotidaustauschfaktor vor, der aufgrund seiner Homologie zu dem Austauschfaktor aus *Drosophila* als *Sos-Protein* bezeichnet wird (Sos: son of sevenless) (Krauss, 1997).

Die Ras-Proteine sind durch ihre Farnesyl- und Palmiotyl-Reste untrennbar mit der Plasmamembran verbunden, um es in die Nachbarschaft zu dem nachgeschalteten Effektormolekül, der *Raf-Kinase* zu bringen (Boguski and McCormick, 1993; Wiesmuller and Wittinghofer, 1994). Neben dieser kann das Ras-Protein noch mit weiteren nachgeschalteten Signalproteinen in Wechselwirkung treten. So sind Interaktionen mit der MEK-Kinase, der Phosphatidyl-Inosit-3-Kinase und den GAP-Proteinen beschrieben. Die Ras-Proteine stehen also im Zentrum eines Netzwerkes verschiedener Signalketten (Burgering and Bos, 1995).

2.5.1.2 Raf

Die *Raf-Kinasen* (MAP-Kinase-Kinase-Kinase/MAPKKK), bestehend aus c-Raf, B-Raf und A-Raf, sind Serin/Threonin-spezifische Kinasen, die innerhalb von 2-3 Minuten nach Stimulation der Zelle durch unterschiedliche Mitogene aktiviert werden (Seger and Krebs, 1995). Sie sind dem Ras-Protein unmittelbar nachgeschaltet. Das aktivierte Ras-Protein geht eine spezifische Wechselwirkung mit der Raf-Kinase ein und vermittelt auf diesem Wege deren Membranlokalisation. Der genaue Aktivierungsmechanismus ist noch nicht gänzlich geklärt. Vermutlich sind weitere Cofaktoren zu deren Aktivierung notwendig, die durch Phosphorylierung von Ser/Thr- oder Tyr-Resten die Aktivität steuern. Hier ist insbesondere die *Proteinkinase C (PKC)* zu nennen, die die Raf-Kinase zu aktivieren vermag (Morrison et al., 1993). Die wesentlichen Effektorproteine der aktivierten Raf-Kinasen sind die *MEK-Kinasen* (MAP-Kinase-Kinase/MAPKK) (Kyriakis et al., 1993).

2.5.1.3 MEK

Die *MEK-Kinasen*, *MEK1* und *MEK2*, stellen eine besondere Form von Proteinkinasen dar, da sie ihr Substrat, die *MAP-Kinasen (ERKs)*, an einem Tyrosin- und einem Threonin-Rest in der Sequenz - TXY - phosphorylieren können, während die anderen bisher genannten Proteinkinasen entweder Tyr- oder Ser/Thr-spezifisch sind. Sie werden daher auch „*dual specificity protein kinases*“ genannt (Seger et al., 1991).

Sie werden durch die vorgeschalteten Raf-Kinasen aktiviert und aktivieren durch Phosphorylierung die nachgeschalteten MAP-Kinasen.

2.5.1.4 MAP-Kinase

Für eine vollständige Aktivierung der bisher 5 bekannten *MAP-Kinasen* dieses Signalweges (*ERK1-5*) ist die Phosphorylierung der Threonin- und der Tyrosin-Reste notwendig. Alle bisher bekannten MAP-Kinasen beinhalten eine - TXY - Sequenz. Drei davon sind besonders untersucht worden, *ERK-1* ($p44^{MAPK}$), *ERK-2* ($p42^{MAPK}$) und *MAPK* ($p40^{MAPK}$), eine gesplante Form. Bei ERK-1 und ERK-2 handelt es sich um Isoformen, welche wesentlicher Gegenstand dieser Arbeit sind. Sie sind „*proline-directed protein kinases*“, da sie Serin oder Threonin-Reste in unmittelbarer Nachbarschaft zu Prolin phosphorylieren. Die häufigste Substratsequenz von Effektormolekülen der ERKs ist Pro-Leu-Ser/Thr-Pro, eine relativ häufig vorkommende Sequenz. Daher schließt man auf eine große Anzahl von Zielproteinen für ERKs. Diese sind sowohl im Cytoplasma, als auch im Kern zu finden (Gonzalez et al., 1991). Die wichtigsten Substrate der ERKs sind *Transkriptionsfaktoren*, die sie nach der Translokation in den Kern durch Phosphorylierung aktivieren können. Der erste experimentell nachgewiesene Transkriptionsfaktor war *c-Jun*, es folgten u.a. *c-Fos* via RSK-Phosphorylierung (ribosomale Protein S6 Kinase), *ATF-2*, *c-Myc*, *c-Myb* und der Transkriptionsfaktor *Elk-1* (Segar and Krebs, 1995). Elk-1 bindet zusammen mit einem weiteren Protein, dem Serum-Response-Faktor an das Serum-Response-Element, das man als regulatorische Sequenz vor verschiedenen Genen in höheren Eukaryonten findet. Auf der Ebene von Elk-1 laufen mehrere Signale zusammen, da eine Aktivierung von Elk-1 von auf unterschiedlichen Kinase-Kaskaden aktivierten, verschiedenen MAPK-Proteinen erfolgen kann (s.u.). Ein weiterer wichtiger, durch MAP-Kinasen über c-Fos und c-Jun regulierter Transkriptionsfaktor, ist *AP-1*. Dieser spielt eine zentrale Rolle in der frühen Osteoblasten-Differenzierung (Hipskind and Bilbe, 1998).

Neben dieser downstream-Regulierung vermögen die MAPKinasen auch upstream zu regulieren. Hierbei können sie regulierenden Einfluß auf den

NGF- und den EGF-Rezeptor, auf SOS (son of sevenless), Raf-1 und MEK im Sinne einer Feedback-Regulierung nehmen.

Weitere Substrate findet man interessanterweise im Cytoskelett. Durch Aktivierung der *Microtubulus-assoziierten Proteine 1,2 und 4* (MAP-1,MAP-2,MAP-4) durch ERK1/2 kann es zu einer Umorganisation des Cytoskelettes und zu einer Änderung der Zellmorphologie kommen(Seger and Krebs, 1995). ERKs werden durch Dephosphorylierung inaktiviert. Bekannt sind die *MAP-Kinase-Phosphatase* und die *Protein-Phosphatase-2A (PP-2A)*.

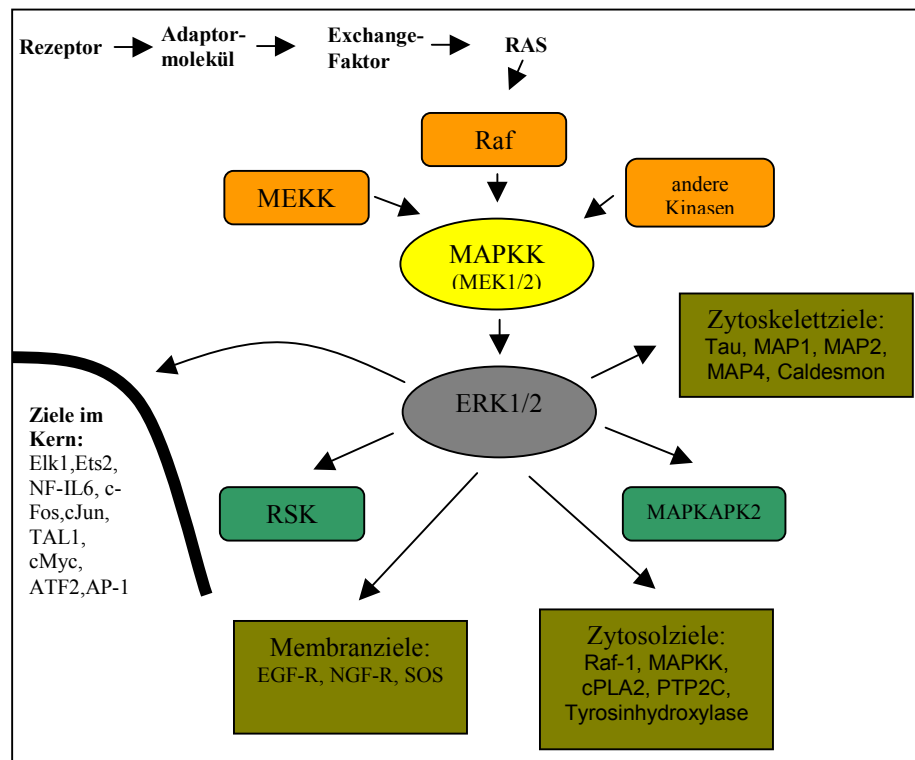


Abb.2.4: Die Effektoren der MAP-Kinase (aus Seger & Krebs, 1995)

In verschiedenen Zellarten ist eine Aktivierung der ERK1 und ERK2 nach mechanischer Belastung bereits bekannt. So wurde u.a. in Endothelzellen (Takahashi et al., 1997), in Herzmyozyten (Sadoshima and Izumo, 1993;Seko et al., 1999) und in Chondrozyten (Hung et al., 2000) eine Aktivierung der MAPkinase ERK1 und ERK2 nach mechanischer Belastung in vitro beschrieben. Diese Zellen besitzen eine wesentlich höhere physiologische Dehnungsbandbreite als Osteoblasten. Sie sind bei möglichen physiologischen Dehnungen von bis zu 250.000µstrain in Muskel- und Endothelzellen (Sumpio B.E. et al., 1994), sowie in

Fibroblasten mit Dehnungen bis zu 10.000 μ strain um ein vielfaches belastbarer als Osteoblasten mit deren physiologischen Belastung bis zu 4000 μ strain. Daten zu einer möglichen mechanoinduzierten Aktivierung der MAPKinasen ERK1 und ERK2 in Osteoblasten lagen zum Zeitpunkt der Experimente für diese Arbeit noch nicht vor.

2.5.2 Die „stress activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase“ (SAPK/JNK) – Kaskade

Auf dem Niveau der oben beschriebenen ERKs stehen in dieser Kaskade die MAP-Kinasen **JNK** und **SAPK**, deren Signalkaskade durch eine Vielzahl von zellulären Stressfaktoren induziert wird. Hier sind insbesondere UV-Strahlung, chemischer, oxidativer, hypo- und anoxischer Stress, „heat shock“, Proteinsyntheseinhibitoren und entzündlich ausgeschüttete Zytokine (z.B. Interleukin-1) zu nennen (Paul et al., 1997). Sie haben den Transkriptionsfaktor *c-Jun* als Substrat. Sie binden an die N-terminale Transaktivierungsdomäne des c-Jun-Proteins und phosphorylieren die Reste Ser63 und Ser73. Als Folge wird eine erhöhte Transkriptionsaktivität von Genen beobachtet, die durch c-Jun kontrolliert werden. Des weiteren werden die Transkriptionsfaktoren *Elk-1* und *ATF-2* reguliert.

Als MAP-Kinase-Kinase konnten bisher *MKK4* und *MKK7*, auf dem MAPKK-Kinase-Level, funktionell den Rafs der ERK-Kaskade entsprechend, die *MEKKs1-4* identifiziert werden. Diese wiederum werden aktiviert durch die Beteiligung der kleinen regulatorischen GTPasen *Rac1* und *Cdc42*, die beide zur Ras-Superfamilie gehören (Hipskind and Bilbe, 1998).

2.5.3 Die p38 MAPK/RK/HOG – Kaskade

Die stress-aktivierte **p38 MAP-Kinase-Kaskade** wird aktiviert durch osmotische Schwankungen, bakterielle Lipopolysaccharide und durch entzündliche Cytokine. Hierdurch kommt es häufig zu einer parallelen Aktivierung der SAPK/JNK-Kaskade und der p38-Kaskade. Als Substrate der p38 MAP-Kinase dienen wiederum Transkriptionsfaktoren, insbesondere *Elk-1*, *SAP-1a*, *ATF-2* und *CHOP*.

Über die Effektorproteine *MAPKAPKs 2 und 3* (*MAP-Kinase aktivierte Protein-Kinasen*) nehmen sie des weiteren Einfluß auf die Transkriptionsfaktoren *CREB*, *HSP27* und möglicherweise *SRF* (Wang and Ron, 1996).

Die upstream-Regulierung verhält sich analog zur ERK-Kaskade, wobei auf der Stufe der MAPK-Kinasen-Kinasen noch weiterer Forschungsbedarf besteht. p38 wird aktiviert durch *MKKs 3,4 und 6*, diese wiederum haben als mögliche Aktivatoren auf der Stufe der MAPKKK *TAK1* (*Transforming Growth Factor beta Aktivated kinase*), *ASK1* (*Apoptosis signal regulating kinase*) und *MTK1* (*MAP Three Kinase*) (Hipskind and Bilbe, 1998).

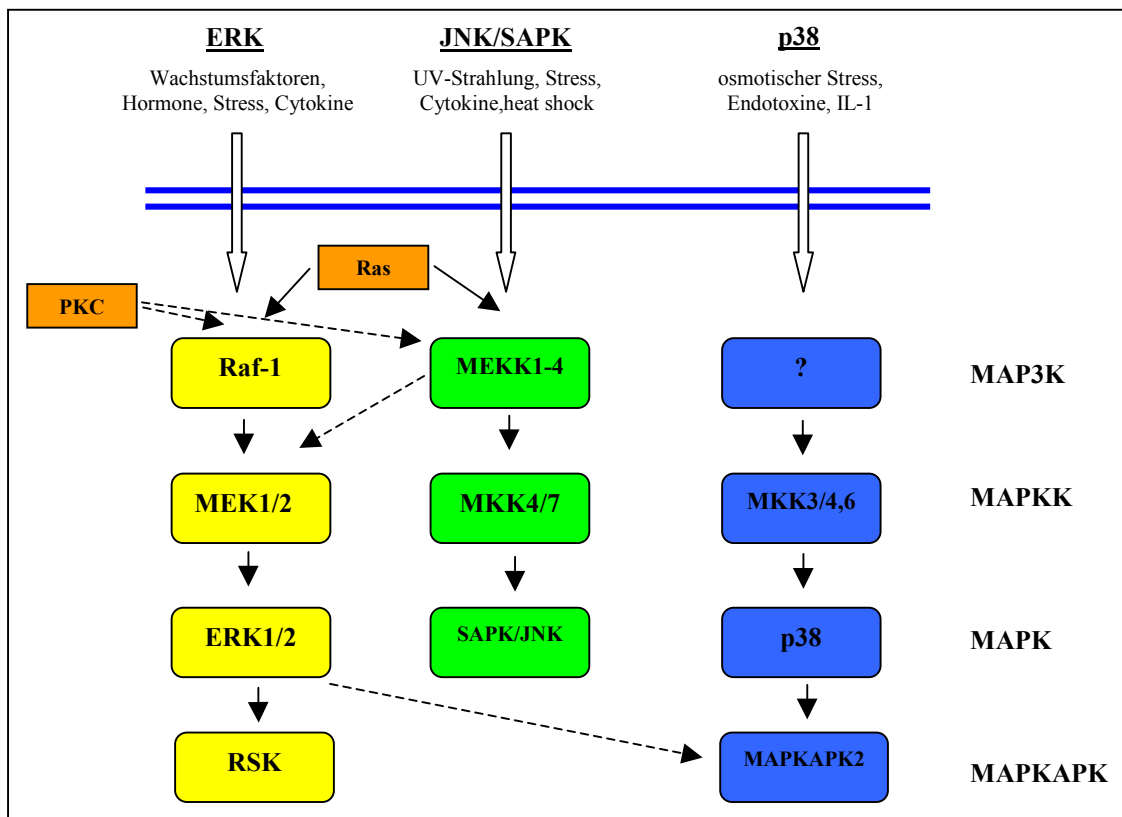


Abb.2.5: schematische Darstellung der 3 unterschiedlichen MAP-Kinase-Kaskaden und deren Verknüpfung, geändert nach Seger und Krebs, 1995.

Zusammenfassend ergibt sich für die MAP-Kinase-Kaskaden ein komplexes und an vielen Stellen noch unvollständiges Bild. Viele unterschiedliche extrazelluläre Signale vermögen diese Wege zu aktivieren, von denen einige parallel verlaufen können. Es wird davon

ausgegangen, dass die verschiedenen Wege vernetzt sind, und dass Verzweigungen auf allen Ebenen erfolgen können. Darüber hinaus können dieselben Substrate durch die unterschiedlichen MAPK-Wege phosphoryliert und aktiviert werden.

2.6 Der Jak-STAT-Weg

Der Jak-STAT-Weg ist ein Signalweg, der von Zytokin-Rezeptoren ausgeht und eine sehr direkte und nur wenige Kopplungselemente umfassende Signalübertragung von der Membran zum Zellkern ermöglicht. Die in Säugetieren hieran beteiligten Protein-Tyrosinkinasen sind mindestens vier verschiedene Janus-Kinasen (Jak-Kinasen). Charakteristisch für sie ist das Vorkommen von zwei Tyrosin-Kinase-Domänen, welche nach Anlagerung an den Rezeptor dessen Tyrosinreste phosphorylieren. Ebenso findet eine gegenseitige Phosphorylierung der für eine Aktivierung benötigten 2 unterschiedlichen Jaks statt, welche dann die nachgeschalteten cytoplasmatischen Effektorproteine, die STATs (Signal Transducer and Activator of Transcription), an deren Tyrosinresten phosphorylieren. Sechs verschiedenen STATs sind derzeit bekannt, STAT 1-6. Nach ihrer Phosphorylierung bilden sie Homo- oder Heterodimerkomplexe und translozieren in den Zellkern. Dort haben auch sie eine stimulierende Wirkung auf die Expression von Genen (Darnell, Jr. et al., 1994).

Lange Zeit galt der Jak/STAT-Weg als einfacher und nicht verzweigter Signaltransduktionsweg. Neuerliche Ergebnisse sprechen allerdings für eine Verbindung des Jak/STAT-Weges mit der MAP-Kinase-Kaskade. Andrew Larner vermutet eine Aktivierung der MAP-Kinase durch Jak (David et al., 1995; Finbloom and Larner, 1995). Des weiteren wird angenommen, dass die MAP-Kinase durch Phosphorylierung der Serinreste der STATs erst deren vollständige Genaktivierung ermöglicht (Zhang et al., 1995). Die bisher als getrennt angesehenen Signaltransduktionswege scheinen also auch auf unterschiedlichen Ebenen miteinander verknüpft zu sein.

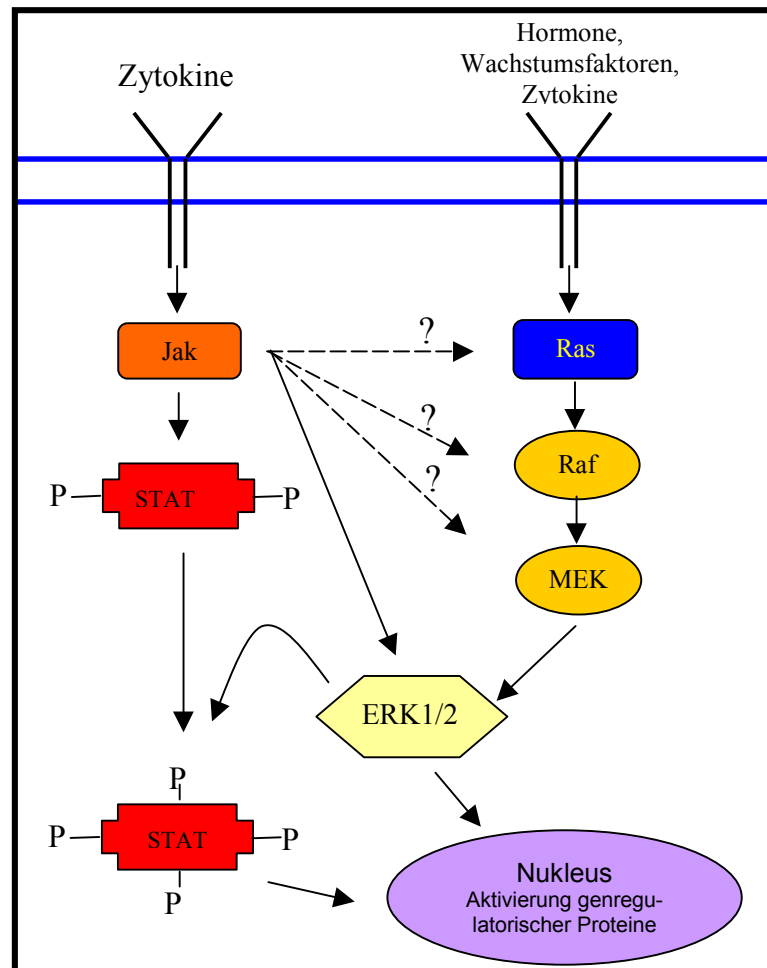


Abb.2.6: Mögliche Interaktionen zwischen den beiden Signaltransduktionswegen Jak/STAT und MAP-Kinase

2.7 Weitere Signalmoleküle

2.7.1 Phospholipase C (PLC)

Phospholipasen sind Enzyme, die Phospholipide spalten. Anhand der Spezifität des Angriffspunktes am Phospholipid werden die Subtypen A1, A2, C und D unterschieden. Von besonderer Bedeutung in Bezug auf die Regulation und die Signaltransduktion in Zellen ist die Spaltung der Inositolhaltigen Phospholipide durch die Phospholipase C. Die PLC katalysiert die Freisetzung der „Second Messenger“ Diacylglycerol (DAG) und Inosit-1,4,5-Triphosphat (IP_3) aus Phosphatidyl-Inosit-4,5-Bisphosphat, einem in Membranen in geringen Mengen vorkommenden Phospholipid. Beide Verbindungen stellen Botenstoffe dar, die weitere spezifische Reaktionsketten aktivieren können. IP_3 aktiviert die Freisetzung von Ca^{2+} , während DAG primär über die Stimulation der Proteinkinase C (s.u.) wirkt.

Derzeit sind drei verschiedene Typen der PLC mit insgesamt 10 Isoformen bekannt, vier PLC β , zwei PLC γ und vier PLC δ (Essen et al., 1996).

Die Aktivierung der PLC kann über zwei zentrale Schaltwege initiiert werden. Phospholipasen des Typs C β werden über, mit Transmembranrezeptoren kommunizierende, G-Proteine aktiviert, während Phospholipasen des Typs C γ durch Transmembranrezeptoren mit intrinsischer oder assoziierter Tyrosinkinaseaktivität aktiviert werden, womit sie in Wachstumsfaktor-kontrollierte Signalübertragungswege involviert sind. Der Mechanismus der Aktivierung der PLC δ ist noch unbekannt (Essen et al., 1996).

Die im Vergleich zum Extrazellularraum niedrige intrazelluläre Calciumkonzentration unterliegt einer strengen zellulären Regulation. Eine kurzfristige gezielte Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ist ein universelles Mittel zur Steuerung von Stoffwechselvorgängen. Hieran beteiligt ist die Freisetzung aus Ca²⁺-Speichern (endoplasmatisches Retikulum), der Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellularraum, sowie der Rücktransport in die Ca²⁺-Speicher. Die primäre Funktion des IP₃ ist die Mobilisierung von Ca²⁺ aus den Speicherorganellen, durch Bindung an den IP₃-Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum. Für den extrazellulären Influx von Ca²⁺ sind verschiedene membranständige Ca²⁺-Kanäle verantwortlich. Man unterscheidet spannungsabhängige und ligandengesteuerte Ca²⁺-Kanäle. Der Rücktransport erfolgt mit Hilfe von ATP-abhängigen Ca²⁺-Transportern. Ca²⁺-Signale, hervorgerufen durch örtliche oder zeitliche Änderungen der Ca²⁺-Konzentration, dienen in vielen Signalwegen als Elemente der intrazellulären Signalleitung.

Während Inosit-1,4,5,-Trisphosphat nach der Abspaltung durch PLC als diffusibles Signalmolekül im Cytosol wirksam wird, verbleibt das hydrophobe Diacylglycerol membrangebunden. Hier aktiviert es die Proteinkinase C (s.u.) (Krauss, 1997).

Jones et Veltel wiesen 1992 nach, dass es durch mechanische Belastung zu einer Aktivierung der PLC in periostalen Osteoblasten, nicht jedoch in

Zellen aus dem Havers'schen System kommt (Veltel D. and Jones D., 1992).

2.7.2 Proteinkinase C

Die Proteinkinasen C sind Ser/Thr-spezifische Proteinkinasen und zentrale Signalproteine, die durch unterschiedliche extrazelluläre Signale aktiviert werden. Als solche sind sie an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Zellproliferation, Apoptose, Plättchenaktivierung, Remodeling des Aktin Zytoskeletts, Modulation der Ionenkanäle und an der Sekretion beteiligt. Derzeit sind in Säugetieren 12 Subtypen nachgewiesen worden mit insgesamt beträchtlicher Heterogenität (Toker, 1998).

Sie zeichnen sich durch eine unterschiedliche zelluläre Lokalisation, eine unterschiedliche Aktivierbarkeit durch Cofaktoren sowie ein unterschiedliches Muster an Substratproteinen aus.

Der Großteil dieser Proteinkinasen wird durch die Cofaktoren Ca^{2+} , Diacylglycerol und Phosphatidylserin aktiviert. Hierdurch ist die Proteinkinase C Bestandteil von Signalübertragungswegen, in deren Verlauf PLC aktiviert und die Botenstoffe $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ sowie Diacylglycerol produziert werden. Folglich findet die Aktivierung der PKC über Rezeptor-Tyrosinkinasen oder über G-Protein gekoppelte Membranrezeptoren statt. Interessant ist die Aktivierung durch Tumorpromotoren, wie z.B. die Phorbolester. Tetradecanoyl-Phorbol-Acetat (TPA) bindet mit hoher Affinität an die Proteinkinase C und führt so zu einer verlängerten Aktivierung, was in zellulären Modellsystemen zur Untersuchung von Signalübertragungswegen genutzt werden kann (Toker, 1998).

Nach Aktivierung der PKC kommt es zu einer Umverteilung des Enzyms vom Cytoplasma zur Membran. Hierbei sind Rezeptorproteine (RACK-Proteine: Rezeptoren für aktivierte Protein Kinase C) beteiligt, die die Membranassoziation der aktivierten PKC vermitteln (Mochlyrosen, 1995).

Die PKC hat eine große Anzahl an Substratmolekülen. Die wichtigsten sind die sogenannten MARCKS-Proteine (Myristoyliertes, Alanin-reiches C-Kinase-Substrat), eine Gruppe von Proteinen, die an physiologisch

wichtigen Vorgängen wie Zellmobilität, Sekretion, Membrantransport sowie an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind. Aktivierte Proteinkinase C interagiert auch mit dem MAP-Kinase Stoffwechselweg. Hierbei kommt es zu einer Aktivierung der Raf-Kinase, wobei die genauen Mechanismen noch unklar sind. Neben den oben aufgeführten, calciumabhängigen PKC-Isoformen (conventional) sind weitere Isoformen bekannt. Unter anderen auch eine Gruppe von calciumunabhängigen PKCs, die sog. n-Isoformen (novel) (Toker, 1998)

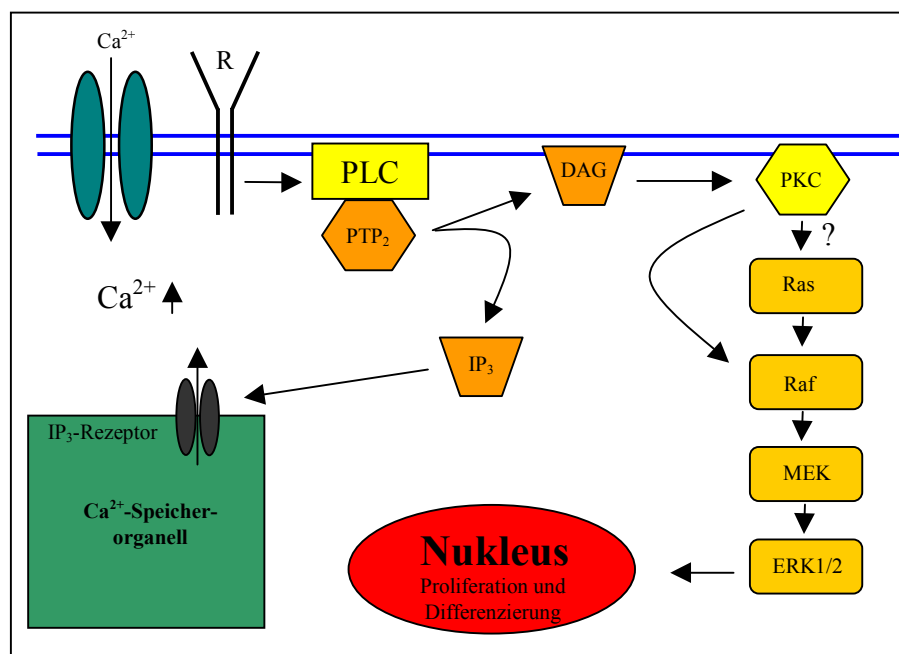


Abb.2.7: Durch Aktivierung von Transmembranrezeptoren mit intrinsischer oder assoziierter Tyrosinkinaseaktivität, durch Aktivierung von G-Proteingekoppelten Rezeptoren oder durch Aktivierung eines hypothetischen „Mechano-Rezeptors“ (R) kommt es zu einer Aktivierung der PLC mit der daraus resultierenden Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-Triphosphat (IP₃) aus Phosphatidyl-Inositol-Bisphosphat (PTP₂). DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die u.a. aktivierend auf die MAP-Kinase-Kaskade wirkt. Durch Bindung des IP₃ an zugeordnete Rezeptoren kommt es durch Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern zu einer Erhöhung der intrazellulären freien Ca²⁺-Konzentration (IFC). (s.Text)

2.8 Der Effekt von Schwerelosigkeit auf die Mechanotransduktion in Osteoblasten

Mechanische Belastung führt zu Knochenwachstum, eine Entlastung zu einer erhöhten Knochendegeneration. Die Raumfahrerfahrten der letzten 20 – 30 Jahre zeigen physiologische Veränderungen bei Menschen während Raumflügen. Insbesondere beinhalten diese Flüssigkeits- und Elektrolytverlust, Verlust von Muskelmasse, Raumkrankheit, Anämie, Störungen des Immunsystems, Calciumverlust und den Abbau von Knochenmasse (Hughes-Fulford et al., 1998).

Bereits nach 84 Tagen Schwerelosigkeit kam es bei Mitgliedern der Skylab Crew zu einer signifikanten Abnahme der Knochenmineralisationsdichte. Aus einem 4,5 – 6 monatigen Aufenthalt im All resultierte bei den meisten Astronauten eine Abnahme der Knochendichte von 1-1,6%, im Bereich des Femurhalses sogar eine Abnahme um bis zu 14% (Herr et al., 1999) (Wronski and Morey, 1983). Biochemische Daten von Astronauten sowie histomorphologische Analysen von Rattenknochen zeigten, dass die Reduzierung der Knochenmasse das Ergebnis einer verminderten Knochenneubildung in Verbindung mit einem normalen oder sogar gesteigerten Knochenabbau ist (Carmeliet and Bouillon, 1999; Landis et al., 2000).

Anhand von tierexperimentellen Studien wurde an Bord von Biosatelliten während des COSMOS 782 Fluges eine Inhibierung der periostalen Knochenformation an jungen Ratten nachgewiesen (Wronski and Morey, 1983). Offensichtlich kommt es durch Schwerelosigkeit zu einer Beeinträchtigung der mRNA-Level für diverse knochenspezifische Proteine im Rattenknochen, zu einer Veränderung der Zell- und Kernmorphologie, sowie zu einer Veränderung der Expression von Wachstumsfaktoren wie IL-6, IGF-I und IGF-Rezeptor, alkalische Phosphatase und Matrixproteinen, wie Kollagen Typ I und Osteocalcin (Bikle et al., 1994; Carmeliet and Bouillon, 1999; Guignandon et al., 1995). Des weiteren wurde eine signifikante Abnahme des Zellwachstums und

eine Beeinträchtigung des Zytoskelettes nachgewiesen (Al-Ajmi et al., 1993; Hughes-Fulford et al., 1998).

1989 wurde eine verminderte Sensitivität der Zellen gegenüber Wachstumsfaktoren wie EGF beobachtet (Rijken et al., 1989). 1999 beschrieb Sato et al. nach einem Raketenexperiment die durch Schwerelosigkeit verursachte fehlende Gen-Aktivierung von c-fos nach EGF-Stimulierung in Osteoblasten-ähnlichen MC3T3-EL-Zellen. Interessanterweise kam es allerdings zu einer unveränderten Aktivierung der MAPKinase im Vergleich mit der Bodenkontrolle. Er folgerte daraus, dass der Einfluß der Schwerelosigkeit auf die Signaltransduktion „downstream“ von MAPKinase angesiedelt sein muß (Sato et al., 1999).

Noch immer wird kontrovers diskutiert, ob die Zellen als solche die Schwerelosigkeit mit Hilfe eines noch unbekannten Gravitationssensors direkt perzeptieren, oder ob sie dies indirekt über die veränderten Bedingungen der Zellmatrix wahrnehmen (Cowin, 1998; Vico et al., 1998).

Zusammenfassend kann derzeit noch keine definitive Aussage über die Graviperzeption der Zellen getroffen werden. Weitere Experimente an Bord der ISS, durch Parabelflüge oder ähnliches werden notwendig sein. Aktuelle Relevanz bekommt die Problematik der „Space-osteoporosis“ durch die geplanten langdauernden interplanetarischen bemannten Weltraumflüge zum Mars und durch die Aufenthalte der Astronauten auf der internationalen Raumstation ISS.

2.9 „Osteoblast like cells“

Osteoblasten sind in vitro nicht sicher von anderen Zellen unterscheidbar. Daher werden sie indirekt nach typischen Produkten und Merkmalen identifiziert. Die in dieser Arbeit verwendeten Versuchszellen wurden aus bovinen Metacarpalia nach der Periostauswachsmethode gewonnen, siehe 3.2 (Jones et al., 1991). Sie wurden im Labor für experimentelle Orthopädie und Biomechanik in zahlreichen Vorversuchen charakterisiert, indem mit Antikörperfärbungen osteoblastentypische Marker nachgewiesen wurden. Hierzu gehörten der Nachweis von Osteopontin, Osteocalcin, alkalischer Phosphatase und Kollagen Typ I. Zellen, die so

ausgewiesen sind, werden als osteoblastenähnliche Zellen (osteoblast like cells) beschrieben. Ein gewisser Vorbehalt ist allerdings stets angebracht, insbesondere dann, wenn Rückschlüsse auf die menschliche Pathophysiologie gezogen werden. In dieser Arbeit ist im Folgenden der Begriff Osteoblast mit „osteoblast like cell“ synonym verwendet.

2.10 Zielsetzung der Arbeit und klinische Relevanz

Intrazelluläre Reaktionen auf physiologische Dehnungsreize sind bei den mechanosensiblen Osteoblasten derzeit nur unzureichend aufgeklärt. Zwar ist erwiesen, dass ein physiologischer mechanischer Reiz eine Steigerung der Proliferation, Differenzierung und Aktivierung verursacht, jedoch sind beteiligte Signaltransduktionswege noch weitgehend unbekannt und spekulativ.

Seit mehreren Jahren ist daher die Mechanotransduktion in Osteoblasten Gegenstand der Forschungen im Labor für experimentelle Orthopädie und Biomechanik unter der Leitung von Prof. Dr. Jones an der Philipps-Universität in Marburg. Ziel ist es, Hinweise über die an der Mechanotransduktion beteiligten Signaltransduktionswege, möglicherweise sogar über den „Mechanosensor“ als solchen zu erhalten. Ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung dieser Fragestellung stellen primäre bovine Osteoblasten dar, die auf physiologische Dehnungsreize sehr sensitiv in Form einer erhöhten Proliferationsrate reagieren. Hierzu wurden in unserer Arbeitsgruppe verschiedene Apparaturen („4-point-bending-Maschine“, „ACLAR-Dehnungsgerät“, „Red-baron“) zur Applikation kleinster definierter Reize entwickelt, die es ermöglichen physiologische, homogene und reproduzierbare Dehnungsbelastungen auf Einzelzellen oder Zellkulturen auszuüben.

Gegenstand dieser Arbeit ist der Nachweis einer Beteiligung der MAPKinase-Signalkaskade an der Mechanotransduktion in primären bovinen Osteoblasten. Dazu muß im Vorfeld, nach Etablierung geeigneter Versuchsaufbauten, die Mechanosensibilität der kultivierten POB mittels des MTT-Zellproliferationstestes bestätigt werden. Im Anschluß daran soll

eine mögliche Aktivierung der Isoenzyme ERK1 und ERK2, als wesentlicher Bestandteil der MAPKinase-Signal-Kaskade, durch zyklische mechanische Belastung auf der 4-point-bending-Maschine untersucht werden. Im positiven Fall soll daraufhin die minimal notwendige Zyklusanzahl zur Aktivierung der ERK1 und ERK2 ermittelt und durch Inhibierung der vorgeschalteten MAPKKinase weitere Aussagen über die Aktivierung von ERK1 und ERK2 getroffen werden.

Schließlich soll als weiteres Experiment der Einfluß von Schwerelosigkeit, welche durch Parabelflugmanöver erzielt wird, auf die Aktivierung von ERK1 und ERK2 untersucht werden.

Letzlich soll durch diese Arbeit ein Beitrag zu mehr Verständnis im Bereich der Mechanotransduktion in Osteoblasten geleistet werden. Es soll dadurch gelingen zukünftig, physiologische und pathophysiologische Zusammenhänge besser zu verstehen und um dadurch neue Therapieansätze oder Präventivmaßnahmen bei Erkrankungen des knochenbildenden Systems entwickeln oder bereits bestehende optimieren zu können. In diesem Zusammenhang ist es phantastisch zu verfolgen, wie die kürzliche Entdeckung des RANK/RANKL/OPG-Cytokin-Systems große Erwartungen in die zukünftig mögliche Behandlung von z.B. Osteoporose, Osteopetrose, M.Paget und anderer Knochenerkrankungen weckt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva
Ammoniumpersulfat	Merck
Ascorbinsäure	Wako, USA
BCIP	Sigma
BSA (Albumine bovine Fraction V, standard grade, lyophil)	Boehringer
Calyculin A	Idn, USA
Complete-Mini-Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	Boehringer
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva
L-Glutamin	Sigma
Mercaptoethanol	Merck
Molekulargewichtsstandard (SDS-Page broad range standard)	BioRad
MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma
NBT	Sigma
Penicillin	Boehringer
Streptomycin	Boehringer
TEMED	Serva
Tris	Sigma
Triton X-100	Merck
Trypsin	Sigma
Tween 20	Serva

3.1.2 Lösungen und Puffer

Acrylamidstammlösung	Acrylamid N,N'-Methylenbisacrylamid	29,2g 0,8g
AP-Färbelösung	NBT-Stammlösung BCIP-Stammlösung AP-Puffer	66µl 33µl 10ml
AP-Puffer	NaCl Mg ₂ Cl Tris	100mM 5mM 100mM
BCIP-Stammlösung	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat Dimethylformamid 100%	0,5g in 10ml
Blockierungslösung	Tween 20 BSA (Fraktion V)	0,1% 5%
Coomassie-Entfärbelösung	Methanol Essigsäure	50% 1%
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliantblau R-250 Methanol Essigsäure	0,2% 40% 2%
Laufpuffer	Tris Glycin SDS	25mM 192mM 0,1%
Lysepuffer	Imidazole-HCL pH 6,8 KCl MgCl ₂ EGTA NaF Na-Vanadate Na-Molybdate	20mM 100mM 1mM 10mM 10mM 1mM 1mM

	Calyculin A Triton X-100 Complete-Mini-Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	1µM 1% 1Tabl./10ml
MTT-Stammlösung	MTT, PBS	5mg MTT/ml PBS
NBT-Stammlösung	NBT Dimethylformamid 70%	0,5g in 10ml
PBS	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ pH	136mM 2,6mM 8mM 1,1mM 7,4
Ponceau S-Färbelösung	Ponceau S Trichloressigsäure Sulfosalycilsäure	0,2% 3% 3%
Sammelgelpuffer	Tris SDS pH	125mM 0,1% 6,8
SDS-Probenpuffer	Tris-HCl SDS Glycerin EDTA Bromphenolblau pH	125mM 2% 10% 1mM 0,01% 6,8
TBS	NaCl KCl Tris	8g 0,2g 2g
Transferpuffer	Tris Glycin SDS Methanol	48mM 39mM 0,0375% 20% (v/v)
Trenngelpuffer	Tris-HCl SDS pH	375mM 0,1% 8,8
Vitamin C-Phosphat Stammlösung	WAKO Chemical Ind., Japan	5mg/ml PBS

3.1.3 Primärzellen und Zelllinien

Primäre Osteoblasten (POB)	Rind	(Jones and Bingmann, 1991)
----------------------------	------	----------------------------

3.1.4 Antikörper

Anti-activated MAP-Kinase (ERK1/ERK2)	Sigma, M8159
Anti-Mouse-IgG aP conj.	Dako, D 0314

3.1.5 Aktivatoren

Epidermal-Growth-Faktor (EGF)	Calbiochem, Kat.-Nr.324831
-------------------------------	----------------------------

3.1.6 Inhibitor

MEK-Inhibitor, PD98059	Calbiochem, Kat.-Nr.513000
------------------------	----------------------------

3.1.7 Nährmedien

Earles Salzlösung		Biochrom KG
Fötale Kälberserum (FCS)	Chargennummer: 14713902 Chargennummer: S0112/511S	Boehringer Mannheim Seromed
Ham's F10		Biochrom KG
Hepes Medium	Medium mit NaHCO_3	
High Growth Enhancement Medium (HiGEM)	modifiziertes DMEM, Fructose statt Glucose	Bio Whittaker
Tyrodellösung	NaCl KCl CaCl_2 MgCl_2 NaHCO_3 NaH_2PO_4 Glucose	136,9 mM 2,68 mM 1,8 mM 1,05 mM 11,9 mM 0,42 mM 5,55 mM ph 6,8 für 5 Vol% CO_2

Alle Zellkulturmedien enthalten 10% FCS (Ausnahme siehe Versuchsbeschreibung), 10µg/ml Vit C-Phosphat, 2mM L-Glutamin, und je 50E/ml Penicillin/Streptomycin.

3.1.8 Geräte und verwendetet Materialien

ACLAR 32C Folie	Allied Chemical. Clifton. NJ. USA
Aquarium-Silikonkleber	Dow Corning
Autoklav	Guwina Berlin
Begasungsbrutschrank für die Zellkultur	Heraeus Instruments
Counter Z1 (Zellzähler)	Coulter
Gewebekulturflaschen 250ml	Greiner Labortechnik
Gewebekulturschalen (Petrischalen)	Nalge Nunc International
Mini-Gel-Elektrophorese	BioRad
Phasenkontrastmikroskop	Olympus CK2 (BH2-RFCA)
Power-Supply 200 (Stromquelle)	BioRad
PVDF-Blot-Membran (0,2µm)	BioRad
Rotoren	Beckmann JA20
Semi-Dry-Westerblot-Apparatur	Biometra
Silikon	med. Qualitätsgrad 55Shore A
Sterilfilter 0,22µm Porengröße	Schleicher&Schuell
Sterilisationsofen	Heraeus Instruments
Sterilwerkbank	Gelaire BSB
Vier-Punkt-Dehnungsmaschine incl. Motor und Steuereinheit	Eigenentwicklung (Jones et al., 1993)
Zentrifuge für Parabelflug	Eigenentwicklung Jones et al
Zentrifugen	Eppendorf 5415C Heraeus Christ Biofuge A Beckmann J2-21 M/E Hettich Universal

Die zur üblichen Standardlaborausstattung zählenden Geräte und Materialien werden an dieser Stelle nicht aufgelistet.

3.2 Die Zellen und Zellkultur

3.2.1 Präparation primärer boviner Osteoblasten

Bei den für die durchgeführten Dehnungsexperimente benutzten Zellen handelte es sich um primäre bovine Osteoblasten (im folgenden „POB“ genannt), welche aus dem Periost von Metacarpalia ca. 18 Monate alter Jungbullen nach dem Periost-Auswachsverfahren von Jones et al. (Jones et al., 1991) gewonnen wurden. Das 1-2h alte Material stammte aus dem örtlichen Schlachthof, wurde nach oberflächlicher Desinfektion mit 70%igem vergälltem Alkohol unter sterilen Kautelen vom umgebenden Weichteilmantel abpräpariert und mehrmals mit sterilem, auf 37°C vorgewärmten, PBS abgespült. Anschließend wurde das Periost vom freipräparierten Knochen aus dem Bereich der Diaphyse in ca. 5mm breiten Perioststreifen entfernt, wobei auf möglichst geringe Verunreinigungen in Form von Muskel-, Faszien oder Fettgewebe geachtet wurde. Diese Perioststreifen wurden dann in sterilem Earles Puffer 3x für jeweils 10 min in einer verschlossenen Glasflasche auf einem Überkopfschüttler bei 37°C gewaschen und abschließend unter Zugabe von 250 U/ml Penicillin und 375 U/ml Streptomycin für 20 min bei 37°C behandelt.

Material

PBS (phosphat buffered saline)
Earles Puffer
Penicillin/Streptomycin

3.2.2 Zellkultur

Zur Kultivierung wurden diese Streifen in ca. 5x5mm große Perioststücke geschnitten, in einer Dichte von ca. $1\text{cm}^2/15\text{cm}^2$ auf den Petrischalen ausgesetzt und mit HiGEM-Medium inklusive 10% fötalem Kälberserum (FCS) versorgt. Die Inkubation erfolgte im CO₂ Begasungsbrutschrank (5% CO₂) bei 37°C. Bereits am Folgetag wurde ein Mediumwechsel zur Entfernung von Verunreinigungen durchgeführt, im weiteren Verlauf einmal pro Woche. Während der Kultivierung wurde regelmäßig auf Infektionen oder Verunreinigungen geachtet und evtl. befallene Zellschalen sofort entsorgt. Nach ca. 4-6 Wochen erreichten die

Zellkulturen einen konfluenten Zellbewuchs, so dass sie für die Experimente oder für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff (=Kryokonservierung) weiterbearbeitet werden konnten.

Material

High growth enhancement Medium (HiGEM) incl. 10% fötalem Kälberserum (FCS)

3.2.3 Ablösen, Einfrieren und Aussetzen der Zellen

Die POB der konfluenten Petrischalen wurden nach Entfernung des Mediums und zweimaliger Waschung mit PBS mittels Collagenase (8ml einer 4%igen Collagenaselösung für 20 Minuten bei 37°C) und Tyrodelösung (8ml für 10 min bei 37°C) von der Oberfläche der Petrischalen gelöst und in 16 ml Ham's F10-Medium zur Zentrifugation bei 500 x g für 10 min aufgenommen. Das erhaltene Zellpellet wurde nun der erforderlichen Verwendung entsprechend in Medium resuspendiert:

Sollten die Zellen direkt für Versuche verwendet werden, so wurden diese nach der Zentrifugation auf die gewünschte Zielkonzentration in Ham's F10-Medium resuspendiert und in die entsprechenden Versuchskulturgefäße überführt. Die Konzentration der angewachsenen Zellen sollte 60.000 Zellen/cm² betragen, dementsprechend wurde die Zellsuspension verdünnt. Hierzu wurden 50µl der Resuspension in 10 ml isotoner NaCl-Lösung geben, auf einem Rüttler durchmischt und in einem Zellzähler (Coulter ZM Cell-Counter) gezählt. Erster Mediumwechsel erfolgte nach 24h.

Zur Kryokonservierung wurde das Pellet auf eine Zielkonzentration von 10×10^6 Zellen/ml verdünnt, mit einem Volumen Einfriermedium, welches die Bildung von intrazellulärer Kristallbildung verhindert, versehen, in 1,8 ml Kryoröhrchen überführt und durch die Einbringung in einen Styroporbehälter in einem -80°C kaltem Gefrierschrank definiert mit ca. 1°C pro Minute langsam abgekühlt. Nach 12 Stunden erfolgte die Lagerung in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen tiefgefrorener Zellen wurden diese in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt, in Medium

resuspendiert und mit 200 x g sedimentiert. Das Pellet wurde erneut auf die erforderliche Zielkonzentration verdünnt (60.000 Zellen/cm² Kulturoberfläche) und in das entsprechende Kulturgefäß gegeben. Nach 24h erfolgte auch hier ein erster Mediumwechsel.

Material

Collagenase	4% (w/v) in Ham's F10
Tyrolösung	
Ham's F 10 incl. 10% FCS	
Einfriermedium	Ham's F 10; 20%(v/v) DMSO

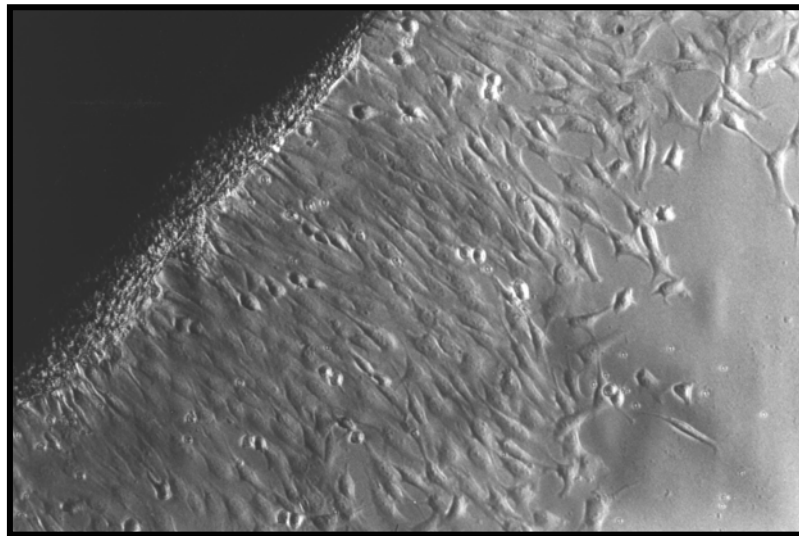


Abb.3.1: POB nach dem Periostauswachsverfahren, 3 Tage alte Zellkultur. Am linken oberen Bildrand ist das Perioststückchen zu erkennen.

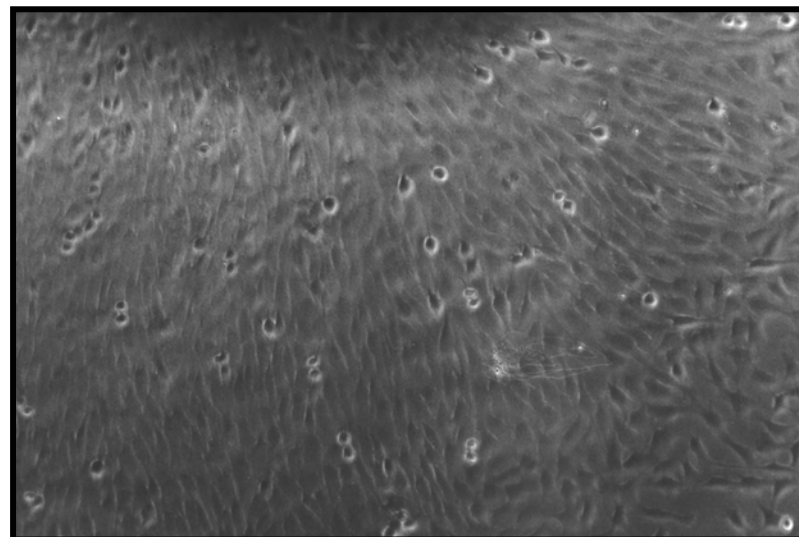


Abb.3.2: POB nach dem Periostauswachsverfahren, 5 Tage alte Zellkultur. Am oberen Bildrand ist das Perioststückchen zu erkennen.

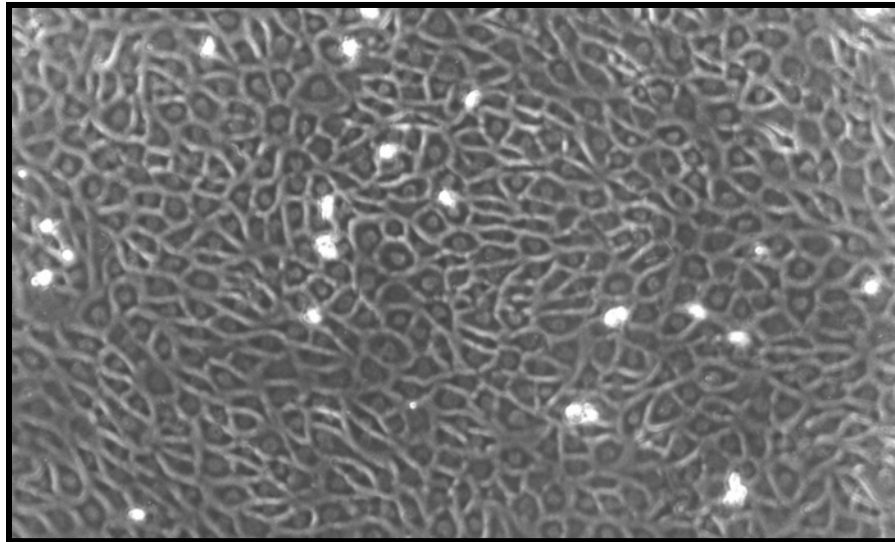


Abb.3.3: Ausschnitt aus einer konfluenten POB-Primärkultur. Bei den hellen Punkten handelt es sich um abgelöste Zellen.

3.2.4 Lysieren der Zellen

Nach Beendigung der in Kapitel 4 beschriebenen Versuche wurden die Zellen für die weiterführenden molekularbiologischen Untersuchungsverfahren lysiert, d.h. die Zellmembran zerstört, um die intrazellulären Proteine den Nachweisverfahren zugänglich zu machen. Hierzu wurden die POB bei Versuchsende zum Abstoppen intrazellulärer Stoffwechselvorgänge mit 5°C kaltem PBS gespült, auf Eiswasser gelagert und mittels Zellschaber von der Oberfläche der Versuchsplatten abgeschabt. Die Zellen wurden zusammen mit geringen Mengen PBS in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 10 Minuten mit 500 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und schließlich das Pellet in Abhängigkeit von dessen Größe in 100-200µl Lysepuffer aufgenommen. Der Lysepuffer enthielt Protease-Inhibitoren, um eine Aufspaltung der Proteine durch zelleigene Proteasen zu verhindern. Nach Durchmischung auf dem Vortex-Mischer und einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur erfolgte eine erneute Zentrifugation mit 2500 x g zur Sedimentation der nicht benötigten Zellfragmente (Zellkerne, Zytoskelett und DNA). Der Überstand - das Untersuchungsmaterial dieser Arbeit in Form von Enzymen und Proteinen beinhaltend - wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Material

PBS
Lysepuffer

3.3 Dehnungsexperimente

3.3.1 Prinzip der Dehnungsexperimente

Nach Anwachsen der Zellen auf den Versuchskulturplatten in FCS-haltigem Ham's F10 Medium mit einer Dichte von 60.000 Zellen/cm² erfolgte ein Mediumwechsel mit FCS-freiem Ham's F10 Medium 24h vor Versuchsbeginn, um den Einfluß von FCS auf die Aktivierung des Ras/Raf-Pathways zu verhindern, da die darin enthaltenen Wachstumsfaktoren über die in Kapitel 2 beschriebenen Rezeptor-Interaktionen zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 führen würden. Der Einfluß der Dehnung auf die MAP-Kinasen wäre so nicht beurteilbar gewesen. Jetzt wurden - in Abhängigkeit von den jeweiligen Versuchen - die Dehnungen durchgeführt, u.U. nach vorheriger Inhibitorenzugabe (s. MEK-Inhibitor), unter Herstellung einer Positivkontrolle (Epidermal Growth Faktor, 50µg/ml Medium für 20 min) und einer Negativkontrolle (ungedehnte Proben).

Nach der Dehnung erfolgte die Probenaufbereitung für den Immuno-Blot. Dies beinhaltete die Lysierung der Zellen, Proteinmengenbestimmung der Zelllysate durch das Bradford-Protein-Assay, SDS-PAGE, Westernblot und den colorimetrischen Nachweis der aktivierten Form der MAP-Kinasen.

Material

Ham's F10 mit 10% FCS	BioChrom KG
Ham's F10 FCS-frei	BioChrom KG
Epidermal-Growth-Faktor (EGF)	Calbiochem, Nr.: 324831

3.3.2 Die Vier-Punkt-Dehnungsmaschine

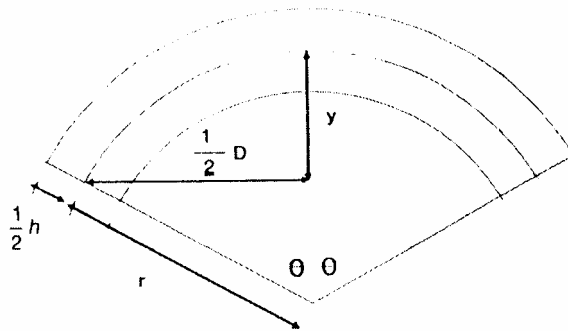
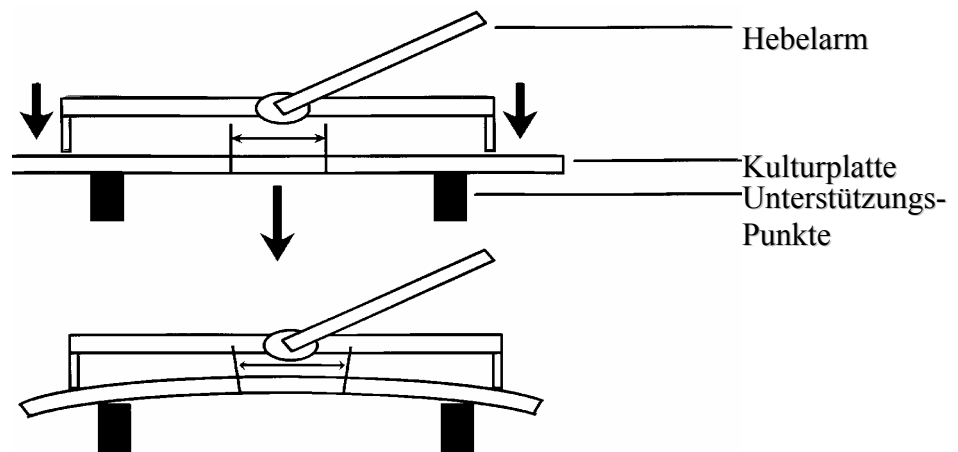
Die Notwendigkeit, die physiologische Antwort der Osteoblasten auf mechanische Belastung reproduzierbar und definierbar untersuchen zu können, machte einen Versuchsaufbau erforderlich, mittels dem es ermöglicht wurde, definierte Belastungen auf alle Zellen gleichförmig ausüben zu können. Die Apparatur für Dehnungsexperimente sollte folgende Bedingungen erfüllen:

- Elastizität
- Zelladhäsion an der Oberfläche
- Zellwachstum und Zelldifferenzierung an der Oberfläche

Hierzu entwickelte Jones 1987 die sog. 4-Punkt-Dehnungsmaschine, durch die auf Polykarbonat adhärente Zellkulturen uniforme, physiologische Dehnungsreize einfach appliziert werden können, ohne komplizierte Dehnungsmessgeräte benutzen zu müssen (Jones et al., 1993). Die Berechnung der Oberflächenbelastung und damit der Zellbelastung basiert auf der geometrischen Situation. Dadurch wird es möglich, durch Anwendung der Formel die Einstellungen der Dehnungsapparatur für die gewünschte Belastung einfach berechnen zu können. Die Kulturplatte wird über zwei Auflagepunkte gebogen, woraus eine kreisförmige Verformung der Oberfläche resultiert. Die Dehnung (konvexe Seite), wie auch die Kompression (konkave Seite), ist hierbei, wie in den meisten homogenen Materialien, an der Oberfläche gleich. Die mittlere Achse ist die sog. neutrale Achse, da sie weder Dehnung noch Kompression erfährt. Die Dehnung ($\text{Strain} = S$) der Oberfläche hängt von folgenden Bedingungen ab:

- Abstand der Auflagepunkte (D)
- Materialdicke (h)
- Höhe der Auslenkung ($\text{deflection} = y$)

Strain ist definiert als eine Änderung der Länge pro Längeneinheit und ist dimensionslos. 1 Strain bedeutet also eine Längenänderung von 100%. Die in den durchgeführten Experimenten applizierte Dehnung betrug $4000 \mu\text{strain}$ mit einer Frequenz von 1 Hz. Dies entspricht einer physiologischen uniaxialen Dehnung eines Knochens um 0,4%. Die Anzahl der Dehnungen war in den verschiedenen durchgeführten Experimenten variabel.

Abb.3.4: Funktionsweise der 4-Punkt-Dehnungsmaschine**Abb.3.5:** Geometrische Beschreibung der Biegung einer (Kultur-)Platte zwischen 2 Stützpunkten, die eine kreisförmige Verformung zur Folge hat (Jones et al, 1993):

h =Plattenstärke
 D =Abstand zwischen den Stützpunkten
 Y =Auslenkung
 S =Strain
 r =Radius

Mathematische Beschreibung:

$$S = \frac{4hy}{D^2 + 4y^2}$$

Material

4-Punkt-Dehnungs-Maschine
digitale Schiebelehre

3.3.3 Aufbau der Polykarbonatplatten

Polykarbonat ist ein harter, thermostabiler Kunststoff. Er zeichnet sich durch hohe elastische Deformierbarkeit aus, indem die Gitterbausteine nicht über das Maß der inneren elastischen Kräfte hinaus aus ihrer Gleichgewichtslage ausgelenkt werden. Bei der Dehnung durch die Kraft der Hebelarme werden die oberen Schichten der Platte gedehnt, während die unteren Schichten gestaucht werden. In der Mitte liegt die „neutrale Achse“, die ihre ursprüngliche Länge beibehält.

Die Polykarbonatplatten hatten eine Größe von 5x13cm bei einer Dicke von 3mm. Durch Silikonstückchen wurde ein 5x5cm großes Feld abgeklebt. Als Klebstoff diente „Dow Corning“ Aquariumsilikonkleber. Die

fertiggestellten Behälter wurden nach Aushärtung des Klebstoffs über Nacht in ddH₂O eingelegt, um verbliebene zytotoxische Monomere und Acetat auszuspülen. Vor dem Aussäen der Zellen wurden die Platten gassterilisiert oder alternativ für 20 min in 70%igem vergälltem Ethanol behandelt, unter der Sterilwerkbank getrocknet und mit sterilem PBS gewaschen. Nach Aussetzen der Zellen mit einer Dichte von 60.000Zellen/cm² wurde die Silikonkonstruktion mit einem sterilen Glasdeckel versehen. Alle Dehnungsexperimente wurden in einem Warmraum bei 37°C durchgeführt. Dabei verweilten alle Platten, einschließlich der Kontrollgruppen gleichzeitig und gleichlang im Warmraum.

Material

Polykarbonatplatten (5x13x0,3cm)
Silikonmatten (med. Qualitätsstandard 55 Shore A)
Aquarien-Silikonkleber (Dow Corning)

3.3.4 MTT-Zellproliferationsassay

Das Tetrazolin-Salz (3-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-bromide) ist eine blaßgelbe Substanz, die von lebenden, stoffwechselaktiven Zellen aufgenommen und im Mitochondrium dieser Zellen durch Spaltung des Tetrazolinringes mittels der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase in ein dunkelblaues wasserunlösliches Formazanprodukt gespalten wird. Diese Kristalle können durch organische Lösungsmittel gelöst werden. Hierdurch kann Zellproliferation, Vitalität und Zytotoxizität durch photometrische Bestimmung bei 580nm bestimmt werden, da ein direkter proportionaler Zusammenhang zwischen Zellzahl, Stoffwechselaktivität und der Absorption in einer homogenen Zellpopulation besteht. Stoffwechselaktive Zellen produzieren mehr Formazan als weniger aktive Zellen. Die Zellen im Medium absorbieren selbst bei einer Konzentration von 10⁶ Zellen nicht signifikant (Mosmann, 1983).

Zur Proliferationsbestimmung von mechanisch stimulierten Osteoblasten wurden diese in der benötigten Dichte von 60.000Zellen/cm² auf 9-Well Dehnungsplatten (0,5 cm²/Well) ausgesät. Diese Polykarbonatplatten (3mm Dicke) wurden zuvor mit Silikonmatten (jeweils 9-Well) des

medizinischen Qualitätsgrades 55 Shore A unter Benutzung des inerten Aquarien-Silikonklebers „Dow Corning“ verklebt, über Nacht in ddH₂O eingelegt und anschließend dampfsterilisiert. Nach Abschluß des Dehnungsexperimentes wurde das Medium abgesaugt und 100µl MTT-Lösung (Lsg.2) pro Well hinzugegeben. Nach 3 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die MTT-Lösung gegen das Lösungsmittel (Lsg. 3) ausgetauscht und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend folgte nach Überführung der Proben in eine 96 Well Mikrotiterplatte die photometrische Bestimmung der Extinktion bei 580nm. Die statistische Auswertung wurde mit dem Mann-Whitney „U-Test“ vorgenommen (Mann and Whitney, 1947).

Material

MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma
Lsg. 1	MTT-Stammlösung	5 mg MTT/ml PBS
Lsg. 2	MTT-Lösung	1:10 Verdünnung aus Lsg. 1 in Ham's F 10 ohne Zusätze
Lsg. 3	Lösungsmittel	20% SDS (w/v), 50% Dimethyl-formamid (v/v) in ddH ₂ O

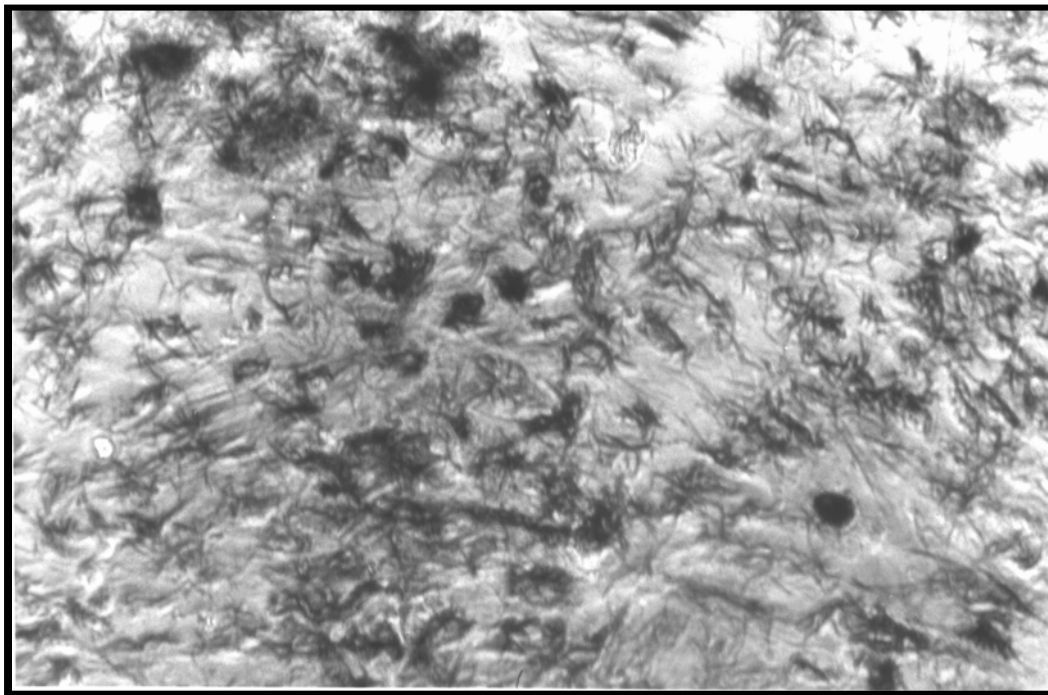


Abb.3.6: Formazan-Kristalle in POB nach Umwandlung des blassgelben MTT in das dunkelblaue Formazan-Produkt durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase.

3.4 Gelelektrophorese und Immunoblot

3.4.1 Bradford-Protein-Assay

Notwendig für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine ist zuvor die Bestimmung der in den Zelllysaten vorliegenden genauen Proteinkonzentration. Als einfache, sensitive und wenig störanfällige Methode bot sich der colorimetrische Proteinnachweis nach Bradford (BRADFORD M.M., 1976) an. Der Nachweis beruht auf der spezifischen Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffes Coomassie Brilliantblau an Proteine über spezifische hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkung. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt unter 1µg Protein in einem 1ml Assay (Read and Northcote, 1981). Der Extinktionskoeffizient des Protein-Farbstoffkomplexes liegt höher als der des freien Farbstoffes, so dass die Extinktion bei einem Absorptionsmaximum von 595nm mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagenz photometrisch gemessen werden kann.

Material

Bovine Serum Albumine (BSA)	Albumin bovine Fraction V, standard grade
Proteinstandard	10% in ddH ₂ O
Farbreagenz	0,01 % Coomassie Brilliantblau G 250 in 1,6 M Phosphorsäure
	0,8 M Ethanol unter Rühren 3h lösen und mit ddH ₂ O auf 1000ml verdünnen und filtrieren
Photometer	

Aus dem Proteinstandard wurden für jede Versuchsreihe zwei Verdünnungsreihen mit 1µg, 2µg, 4µg, 7µg, 10µg, 15µg und 20µg Protein erstellt. Alle Proben wurden mit H₂O auf 100µl aufgefüllt und zusätzlich zwei Leerproben mit 100µl H₂O in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Zeitgleich wurden aus dem Ausgangsvolumen der Proben 1µl, 3µl und 5µl entnommen und ebenfalls auf 100 µl mit ddH₂O verdünnt. Zu jedem dieser Ansätze wurde 900µl Farbreagenz pipettiert und auf dem Vortex-Mixer kräftig gemischt. Nach etwa 5 min bis max. 30 min erfolgte die Messung der Extinktion bei 595nm gegen den Leerwert. Aus den Mittelwerten der Extinktionen der Parallelansätze wurde unter Zuhilfenahme eines selbst erstellten EXCEL-Programmes die Funktion der Eichgeraden erstellt, mit der man die Proteinmenge der unbekannten

Probe berechnen kann. Durch Division der bestimmten Proteinmenge durch das Probenvolumen erhält man die Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) des Proteins in der Ausgangslösung.

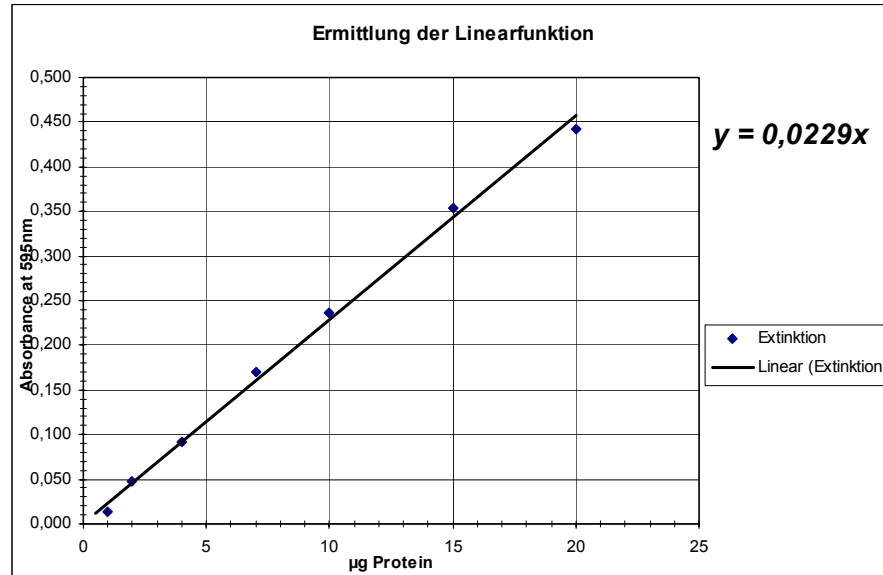


Abb.3.7: Dargestellt ist die Ermittlung der Eichgeradenfunktion. Durch Einsetzen der Extinktionswerte der Lysatproben ($=x$) in die Formel kann einfach der Proteingehalt der Probe ($=y$) ermittelt werden.

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

3.4.2.1 Grundlagen

Aufgrund ihrer amphotheren Eigenschaft besitzen Proteine einen unterschiedlichen Anteil an positiven, negativen und ionisierbaren Aminosäureresten. Prinzipiell ist also die Mobilität innerhalb einer porösen Gelmatrix nicht nur von der Größe der Moleküle, sondern auch von deren Nettoladung unter den jeweiligen Bedingungen abhängig. Um die geforderte Auftrennung innerhalb eines elektrischen Feldes ausschließlich nach der Größe gewährleisten zu können, müssen die Proteine zuvor mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zusammen mit Schwefelbrücken-spaltenden Thiolreagenzien (z.B. β -Mercaptoethanol) vorbehandelt werden. Hierbei werden die Proteine denaturiert und aufgrund hydrophober Wechselwirkung kommt es zu einer gleichmäßigen Beladung der Proteine/Polypeptidketten mit dem negativ geladenen SDS, wobei die Eigenladung der Proteine überdeckt wird. Die so entstehenden SDS-Protein-Mizellen besitzen nun ein konstantes Ladungs/Masse-

Verhältnis und können so, nur aufgrund der Größe, nach dem Molekularsiebeffekt elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Als Trennmedium wurde Polyacrylamid verwandt, welches durch Co-Polymerisation von Acrylamid mit einem Vernetzer (N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis)) aufgrund einer durch freie Radikale ausgelösten Polymerisationsreaktion gebildet wird. Die Radikale entstehen bei der Interaktion von Ammoniumpersulfat (APS) mit Tetramethylethyldiamin (TEMED). Insgesamt entsteht hierdurch ein komplexes, flexibles dreidimensionales Netzwerk. Das Verhältnis von Acrylamid zu Bis entscheidet über den Vernetzungsgrad und damit über die Porengröße.

Üblicherweise werden SDS-denaturierte Proteine in Trenngelen zwischen 5% und 15% T (Konzentration der Gelmatrix) aufgetrennt. Dabei besteht innerhalb eines begrenzten Bereiches eine lineare Beziehung zwischen dem \log_{10} des Molekulargewichtes in Dalton und der relativen Mobilität (R_F -Wert = Wanderstrecke des Proteins/Wanderstrecke der Lauffront). Innerhalb dieses Bereiches können Molekulargewichte unbekannter Proteine durch Interpolation mit Hilfe einer Eichkurve bestimmt werden. Dieser lineare Bereich liegt bei T=10%igen Gelen zwischen 18 – 75 kD; die untersuchten Proteine haben eine Größe von 42 und 44 kD, so dass ein diskontinuierliches homogenes Trenngel nach Laemmli mit T=10% zur Anwendung kam. Diskontinuierlich, da ein großporiges Sammelgel einem engporigen Trenngel aufgelagert ist, homogen, da es sich nicht um ein lineares Gradientengel handelt. Funktion des Sammelgels ist es, zusammen mit dem pH Wert und der Art und Konzentration der Ionen in den verschiedenen Puffern die SDS-Proteinkomplexe so zu konzentrieren, dass sie als schmale Zone in das Trenngel gelangen können (Laemmli, 1970).

Material

Acrylamid-Bis-Stammlösung (30% T, 2,7% C)	29,2g Acrylamid 0,8g N,N'-Methylen-Bisacrylamid mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen und lösen, filtrieren
Sammelgelpuffer	3,0g Tris 0,2g SDS in 50ml ddH ₂ O lösen, mit 5N HCL auf pH6,8 titrieren dann auf 100ml auffüllen und filtrieren Endkonz. im Gel: 125 mMTris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS
Trenngelpuffer	13,6 g Tris 0,3 g SDS in 50ml ddH ₂ O lösen, mit 1N HCL auf pH8,8 titrieren, dann auf 100ml auffüllen und filtrieren Endkonz. im Gel: 375 mMTris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS
Ammoniumpersulfat	1 g in 10 ml ddH ₂ O

3.4.2.2 Herstellen des Sammel- und des Trenngels

Die Mini-Gel Elektrophoreseapparatur von Biorad wurde entsprechend der Anleitung gereinigt und zusammengesetzt. In einem Falcon-Tube wurden 10ml der 10%igen Trenngellösung mit 33µl APS und 8,3µl TEMED versetzt und diese Lösung nach kurzem Schwenken mit einer Pasteurpipette vorsichtig bis ca. 1-1,5cm unterhalb des Glasplattenrandes in die beiden Gelgießformen eingebracht. Anschließend wurde zur Hemmung der Polymerisation durch Luftsauerstoff das Trenngel mit ddH₂O überschichtet. Nach ca. 30 min war die Polymerisation abgeschlossen, zu erkennen an einer deutlichen Trennlinie zwischen Gel- und Wasser. Mit 6ml Sammelgellösung 5%ig, 60 µl APS und 6µl TEMED wurde analog das Sammelgel gegossen. Der Probenkamm mit 9 Zinken wurde eingetaucht bis ca. 5mm über das Trenngel. Nach Polymerisation wurde der Kamm entfernt und die Glasplatten in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Der Elektrodenpuffer wurde in die innere und äußere Kammer gefüllt.

Material

Trenngellösung (T=10%)	10,0ml Acrylamid-Bis 9,9ml ddH ₂ O 10,0ml Trenngelpuffer
Sammelgellösung (T=5%)	1,76ml Acrylamid-Bis 3,2 ml ddH ₂ O 5,0 ml Sammelgelpuffer
Elektrodenpuffer	3,0g Tris 14,4g Glycin 1,0g SDS in 1000ml ddH ₂ O lösen, pH stellt sich auf ca. 8,8 ein Endkonzentration: 25mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS

3.4.2.3 Elektrophorese

Während der Polymerisation wurden die Proben für die Gel-Elektrophorese vorbereitet. Hierzu wurde von den Zelllysaten die 50µg-60µg Protein entsprechende Menge im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer vermischt und anschließend erfolgte die Denaturierung der Proteine im 80°C Wasserbad für 5 min. Wichtig hierbei war eine exakte Pipettierung, da es sich bei den durchgeführten Experimenten um quantitative Analysen über den Aktivierungsgrad der MAP-Kinasen handelte. Nun wurden die Proben vorsichtig in die Geltaschen mittels einer feinen Hamilton-Spritze eingebracht und die Elektrophorese mit 50V / 35 mA gestartet. Zur späteren Größenbestimmung der Proteine wurde jeweils eine Geltasche mit einem Proteinstandard beladen. Bei Eintritt der Farbfront in das Trenngel wurde die Stromspannung auf 150V bei max. 35 mA erhöht, bei Erreichen der unteren Gelebene die Stromquelle abgeschaltet, das Gel für den Western Blot zurechtgeschnitten und 5 min in Transferpuffer äquilibriert.

Material

Minigelapparatur	BioRad
Stromquelle	Power-Supply
SDS-Probenpuffer	125mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS, 1% Glycerin, 20mM DDT, 1 mM EDTA, 0,01% Bromphenolblau
Elektrodenpuffer	
Proteinmolekulargewichtsstandard	BioRad

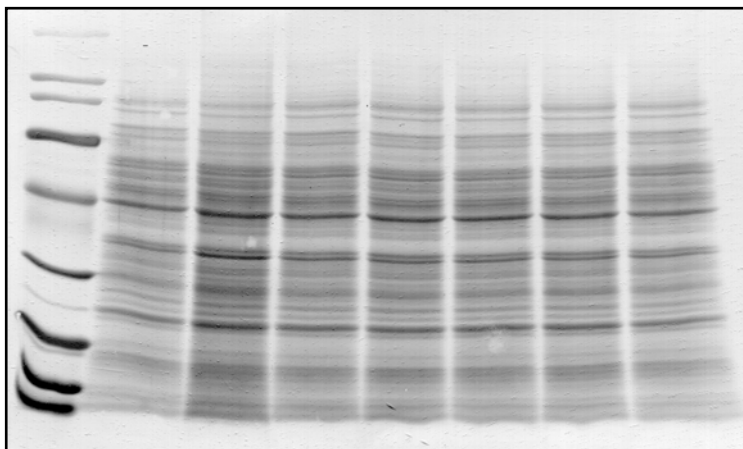


Abb.3.8: Coomassiegefärbtes 10%iges homogenes Trenngel nach Laemmli mit Proteinstandard

3.4.2.4 Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Trägersmembranen (Protein- oder Western-Blot)

Durch die oben beschriebene SDS-PAGE kommt es zu einer Auftrennung der Proteine in Abhängigkeit der Molekülgröße. Um diese weiteren z.B. immunhistochemischen Untersuchungen zugänglich zu machen, ist der Transfer der Proteine auf eine immobilisierende, synthetische Membran ein gängiges Verfahren (=Western-Blotting). Diese Technik ermöglicht das hohe Auflösungsvermögen der Gelelektrophorese mit der Nachweisspezifität immunologischer Verfahren zu kombinieren.

Bei den durchgeführten Experimenten kam das SemiDry-Blotting-Verfahren nach Kyhse-Andersen zur Anwendung (Kyhse-Andersen, 1984). Hierbei liegt ein Gel-Membran-Sandwich zwischen zwei Plattenelektroden. Der Transferpuffer befindet sich auf getränkten Filterpapieren zwischen den Elektroden und dem Transfersandwich.

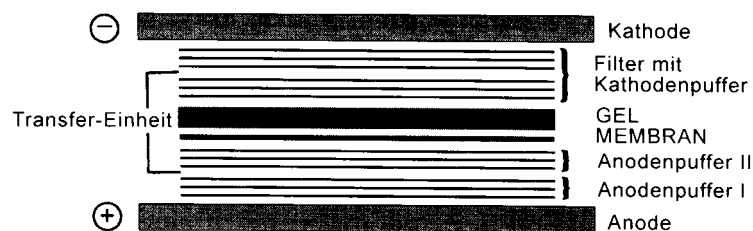


Abb.3.9: Querschnitt durch den Aufbau einer Transferpuffereinheit in einem SemiDry-Blotting Gerät (im Versuch Verwendung eines kontinuierlichen Puffers)

Die verwandte PVDF-Membran mußte vor Gebrauch aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaft für wenige Sekunden in Methanol getaucht, für 5 min in ddH₂O gewaschen und anschließend ebenso wie das Gel 5 min in Transferpuffer äquilibriert werden.

Das Blotten erfolgte bei einer Stromstärke von 250 mA und einer Spannung von 20V für eine Dauer von ca. 70 min. Daran schloss sich die Färbung mit dem sauren Azofarbstoff Ponceau S oder mit Coomassie Brilliantblau zur visuellen Überprüfung der Transferqualität (Gleichmäßigkeit der Proteinmengen, eventuelle Luftblasen) an.

Material

Biometra Fast Blot	Biometra
Filterpapier	Whatman
PVDF-Membran (0,2µm Porengröße)	Bio Rad
Transferpuffer	25mM Tris-Base, 150mM Glycin, 10% Methanol
Ponceau S-Färbelösung	0,2% Ponceau S, 3% Trichloressigsäure, 3% Sulfosalicylsäure
Coomassie-Farbreagenz	40ml Methanol, 2ml Essigsäure, 0,2g Coomassie-Brillantblau R250 mit ddH ₂ O auf 100ml auffüllen und filtrieren
Coomassie-Entfärbelösung	50% Ethanol und 1% Essigsäure in ddH ₂ O

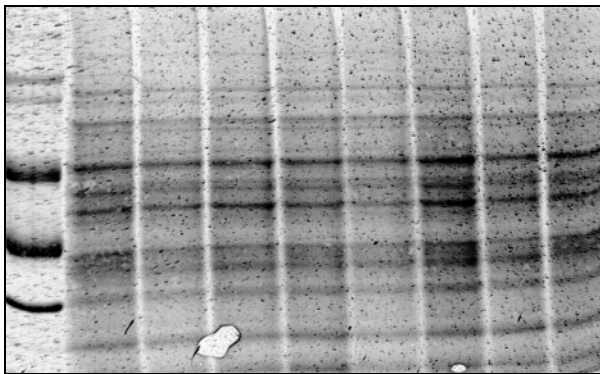


Abb.3.10: PVDF-Membran nach Proteintransfer durch SemiDry-Blotting mit anschließender Ponceau Färbung. Am linken Bildrand befindet sich der Proteinstandard. Zu erkennen sind 2 Luftblasen, die den Transfer an diesen Stellen verhinderten.

3.5 Immunologischer Nachweis der MAP-Kinasen

3.5.1 Grundlagen

Die auf der PVDF-Membran befindlichen denaturierten Proteine/Polypeptide besitzen eine Vielzahl unterschiedlicher antigener Determinanten (Epitope), die mit dagegen gerichteten Antikörpern an spezifischen Bindungsstellen Wechselwirkungen eingehen können (Schlüssel-Schloß-Prinzip). Man unterscheidet monoklonale von polyklonalen Antikörpern. Polyklonale Antiseren enthalten neben 25-30% spezifischer Antikörper überwiegend unspezifische Immunglobuline bezogen auf die zu untersuchenden Epitope. Hierdurch kommt es zu unspezifischen Reaktionen. Bei dem in den Versuchen benutzten Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper der Firma Sigma gegen die aktivierte (phosphorylierte) Form der MAP-Kinasen (ERK1&ERK2). Hierbei ist die Gefahr der unspezifischen Kreuzreaktionen deutlich reduziert, aber nicht ausgeschlossen. Daher blockiert man vor der Antikörperinkubation die Blot-Membran mit einer „Blockierungslösung“

unter definierten Waschbedingungen, um so ungewollte Störsignale zu minimieren.

Um die an das Epitop gebunden Antikörper sichtbar machen zu können, wurde der indirekte immunologische Nachweis mit einem Sekundärantikörper angewandt. Bei diesem Antikörper der Firma Dako handelt es sich um polyklonale Anti-Immunglobulin-Antikörper, die gegen die Klasse der Primärantikörper gerichtet sind (Anti-Mouse-IgG, AP conj). Sie wurden durch chemische Kopplung (Konjugation) mit alkalischer Phosphatase markiert, um dann nach Bindung an die spezifischen Immunkomplexe durch chromogene Substanzen nachgewiesen werden zu können. Als Substrat diente hierbei 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) zusammen mit Nitroblau-Tetrazolium (NBT). Die alkalische Phosphatase löst eine Redoxreaktion aus, welche zu einer intensiv purpurfarbenen Signalgebung auf der PVDF-Membran führt. Der Vorteil dieses indirekten Nachweisverfahrens liegt in einer Verstärkung des Signals und damit in einer Zunahme der Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens.

3.5.2 Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen

Um unspezifische Hintergrundreaktionen zu vermeiden, wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran vor Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht in der Blockierungslösung abgesättigt (blockiert).

Material

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)	8g NaCl, 0,2g KCl, 2g Tris in 800ml ddH ₂ O pH mit HCl auf 7,4 einstellen und auf 1L auff.
Blockierungslösung	5%BSA und 0,1% Tween 20 in TBS

3.5.3 Primärantikörper

Durch Verdünnungsreihen wurde im Vorfeld der Versuche die minimale Antikörperkonzentration ermittelt, bei der ein deutliches Signal bei möglichst geringen Hintergrundsignalen erreicht werden konnte. Diese Konzentration lag bei dem verwendeten Primärantikörper bei 1:15000.

Nach der Blockierung wurde die Membran 3 Minuten in TBS gewaschen und mit 1:15000 Verdünnung des Anti-MAPKinase-AK in Blockierungslösung 2 Stunden auf einem Taumelschüttler inkubiert. Daran schloß sich eine weitere Waschung (3x10min in TBST) an.

Material

Anti-activated MAP-Kinase (ERK1&ERK2)	Sigma, Produkt-Nr.: M8159
TBST	0,1% Tween 20 in TBS

3.5.4 Sekundärantikörper

Der Anti-Mouse-IgG AP-konjugierte Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1500 in TBST angesetzt. Inkubation und Waschschrte erfolgten äquivalent zum Primärantikörper.

Material

Anti-Mouse-IgG AP	Dako, Code-Nr.: D 0314
TBST	

3.5.5 Colorimetrischer Nachweis der Alkalischen Phosphatase

Die nun mit Alkalischer Phosphatase markierten Membranen wurden 5 Minuten in TBS gewaschen, in die Färbelösung gelegt und dann in dieser unter leichter Bewegung bis zum Erreichen erster Farbsignale inkubiert (ca. 2-10min). Danach wurde die Redoxreaktion durch Spülen der Membran in TBS mit 20mM EDTA abgestoppt. Nach Trocknen konnte die Membran fotografiert oder gescannt werden.

Material

BCIP-Stammlösung	0,5g in 10ml 100% Dimethylformamid
NBT-Stammlösung	0,5g in 10ml 70% Dimethylformamid
AP-Puffer	100mM NaCl, 5mM MgCl ₂ , 100mM Tris in 800ml ddH ₂ O, mit 1 N HCl pH auf 9,5 titrieren, auf 1 L auffüllen
TBS	
TBS mit 20mM EDTA	
Färbelösung	66µl NBT-Stammlösung, 10ml AP-Puffer, 33µl BCIP-Stammlösung

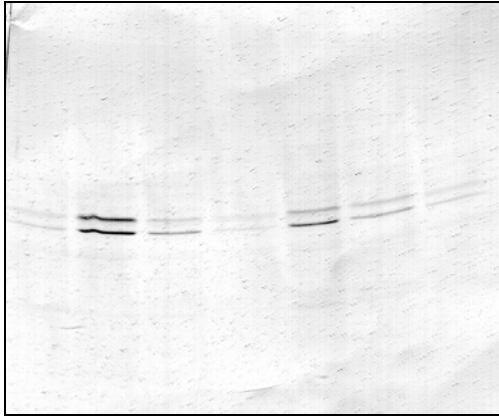


Abb.3.11: Darstellung einer PVDF-Membran nach erfolgtem Westernblot und anschließender Sichtbarmachung des Primärantikörpers Anti-activated-MAP-Kinases durch einen Anti-mouse-APconj. Sekundärantikörper nach Inkubation in der Färbelösung.

3.6 MEK-Inhibitor

Um genauere Rückschlüsse auf den Prozess von der Belastung über die Aktivierung der MAP-Kinasen bis hin zur Stimulierung der Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten ziehen zu können, wurde ein Inhibitor eingesetzt, der die MAPKinase-Kinase (=MEK), als Teil des Ras/Raf-Pathways inhibiert. Dieser Inhibitor (PD98059) blockiert die downstream-Regulierung der MAP-Kinasen nach Einfluss von Wachstumshormonen auf die Zelle (Langlois et al., 1995) (Reiners, Jr. et al., 1998). Interessant erschien die Frage, ob die durch mechanische Belastung nachgewiesene Aktivierung der MAP-Kinasen durch eine Blockierung innerhalb dieses Stoffwechselweges ausbleibt, oder ob trotz Blockierung des unmittelbar zuvor stattfindenden Stoffwechselschrittes die Aktivierung der MAP-Kinasen durch mechanische Belastung auf einem anderen Wege stattfindet.

In einem Vorversuch wurde die optimale Konzentration des Inhibitors PD98059 ermittelt. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt von 5 μ Mol, 10 μ Mol, 15 μ Mol, 20mMol, 25 μ Mol bis 30 μ Mol. Diese Konzentrationen wurden den FCS freien Medien hinzugegeben, nachdem die Zellen für 24h in diesen inkubiert wurden. Die Zellen wurden nun für 22h mit diesem Inhibitor in unterschiedlichen Konzentrationen und anschließend mit 50ng/ml EGF für 20 Minuten zur möglichen Aktivierung der MAP-Kinase inkubiert (Reiners, Jr. et al., 1998). Danach erfolgte die Aufbereitung des Zelllysates für den folgenden Westernblot mit anti-aktivierte MAPKinase AK als Primärantikörper und anti-Maus-APconj-AK als Sekundär-Antikörper. Im Anschluß an diesen Vorversuch erfolgte der

Belastungsversuch, bei dem die Zellen der zuvor ermittelten Inhibitorkonzentration für 22h ausgesetzt und dann mit 4000 μ strain auf der 4-Punkt-Dehnungs-Maschine 30x unter 1Hz belastet wurden, mit anschließender Inkubationszeit von 2min, 5min, 7min und 10min. Parallel dazu wurden eine EGF-stimulierte Positivkontrolle, eine EGF-stimulierte mit MEK-Inhibitor versehene Positivkontrolle und eine ungedehnte Negativkontrolle hergestellt. Mit sämtlichen Lysaten wurde in gewohnter Weise für den Immunoblot verfahren.

Material

Ham's F10 FCS frei
EGF
MEK-Inhibitor (PD98059)

3.7 Parabelflug

Untersuchungen zum Einfluss der Schwerelosigkeit auf die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK 1 und ERK 2 war Ziel dieses Experimentes. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR) und der European Space Agency (ESA) an Bord eines Airbus A300 in Bordeaux durchgeführt. Dazu wurden vor Ort die primären Osteoblasten aus den Kultflaschen, in denen sie nach Bordeaux verbracht wurden, in spezielle, mit ACLAR-Folie ausgestattete Inkubationsschalen überführt. Das Anwachsen der Zellen erfolgte mit FCS-haltigem HEPES-Medium in einem 37°C Inkubator. 24 Stunden vor dem Versuch erfolgte der Mediumwechsel mit FCS freiem HEPES Medium. Am Versuchstag selbst wurden die insg. 8 Zellschalen in eine beheizbare Zentrifuge eingebracht, wobei jeweils 4 an den Armen der Zentrifuge und 4 weitere am nicht rotierenden Rand angebracht wurden. Die Zentrifuge war mit einem Temperatursensor und einer Heizung ausgestattet, so dass eine konstante Temperatur von 37°C gewährleistet werden konnte. Die Zellen wurden gleichen Bedingungen ausgesetzt.

Durch 30 Parabel-Flugmanöver wurde innerhalb des Flugzeuges für jeweils ca. 30 Sekunden Schwerelosigkeit erzeugt. Während dieser Phasen wurden die an den Armen der Zentrifuge befindlichen Zellen durch Rotation der Zentrifuge weiterhin der normalen Erdbeschleunigung (1g)

ausgesetzt (=Negativkontrolle), während die Zellen der Positivkontrolle in dieser Zeit der Schwerelosigkeit ausgesetzt waren. Nach der 1., der 15., der 30. und nach weiteren 7min nach der 30. Parabel wurden jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle der Zentrifuge entnommen und in einer an Bord befindlichen Kühlbox unverzüglich auf eine, den Stoffwechsel der Zellen inhibierende Temperatur abgekühlt.

Die Zellen wurden unmittelbar nach der Landung in einem am Flughafen eingerichteten Labor in üblicher Weise lysiert. Das Proteinlysate wurde auf Trockeneis ins Labor der Universitätsklinik Bordeaux transportiert und von dort tiefgekühlt für die Durchführung der Analysen nach Marburg transportiert.

Material

Zentrifuge
Kühlbox
8 Zellkulturplatten (2 Reservekulturplatten)
Lysepuffer, PBS, Trockeneis

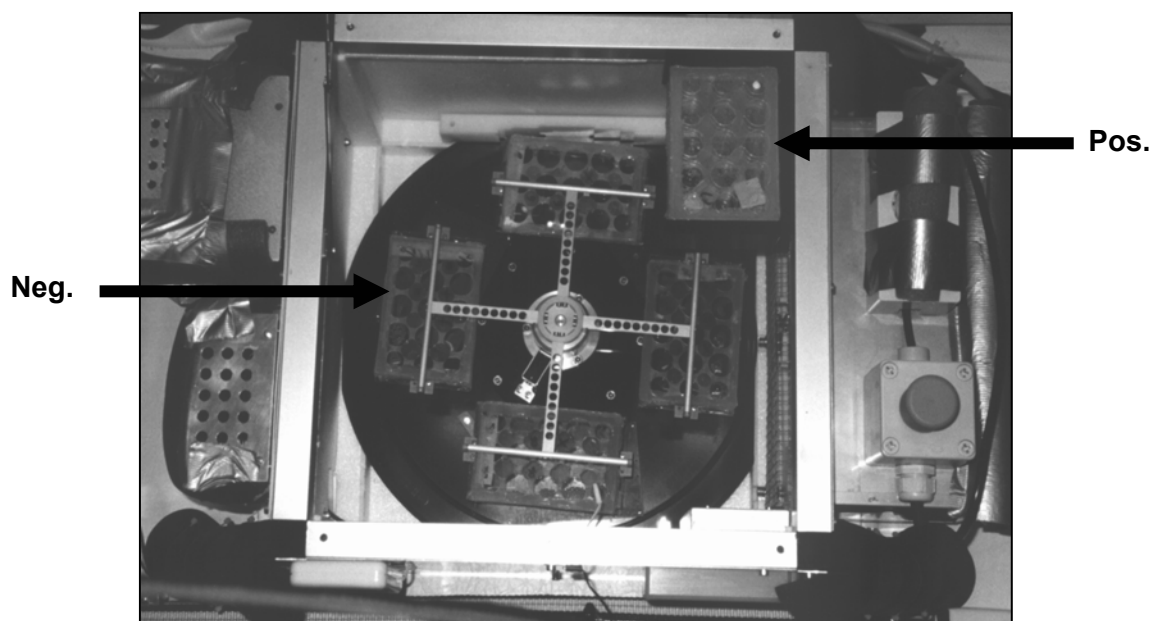


Abb.3.12.: Aufsicht auf die an Bord befindliche Zentrifuge. An den Rotorarmen befinden sich die Negativkontrollen, rechts oben die Positivkontrollen.

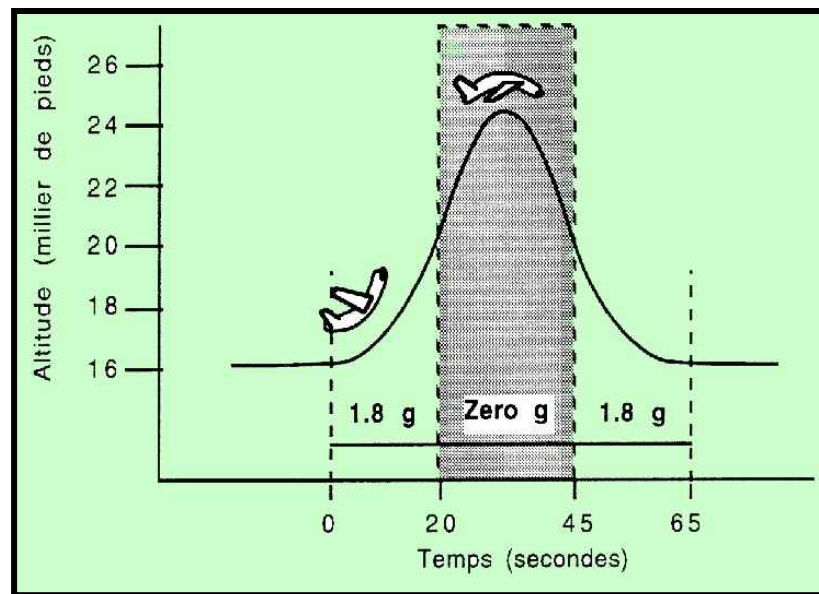


Abb. 3.13.: Schematische Darstellung eines Parabelflugprofils

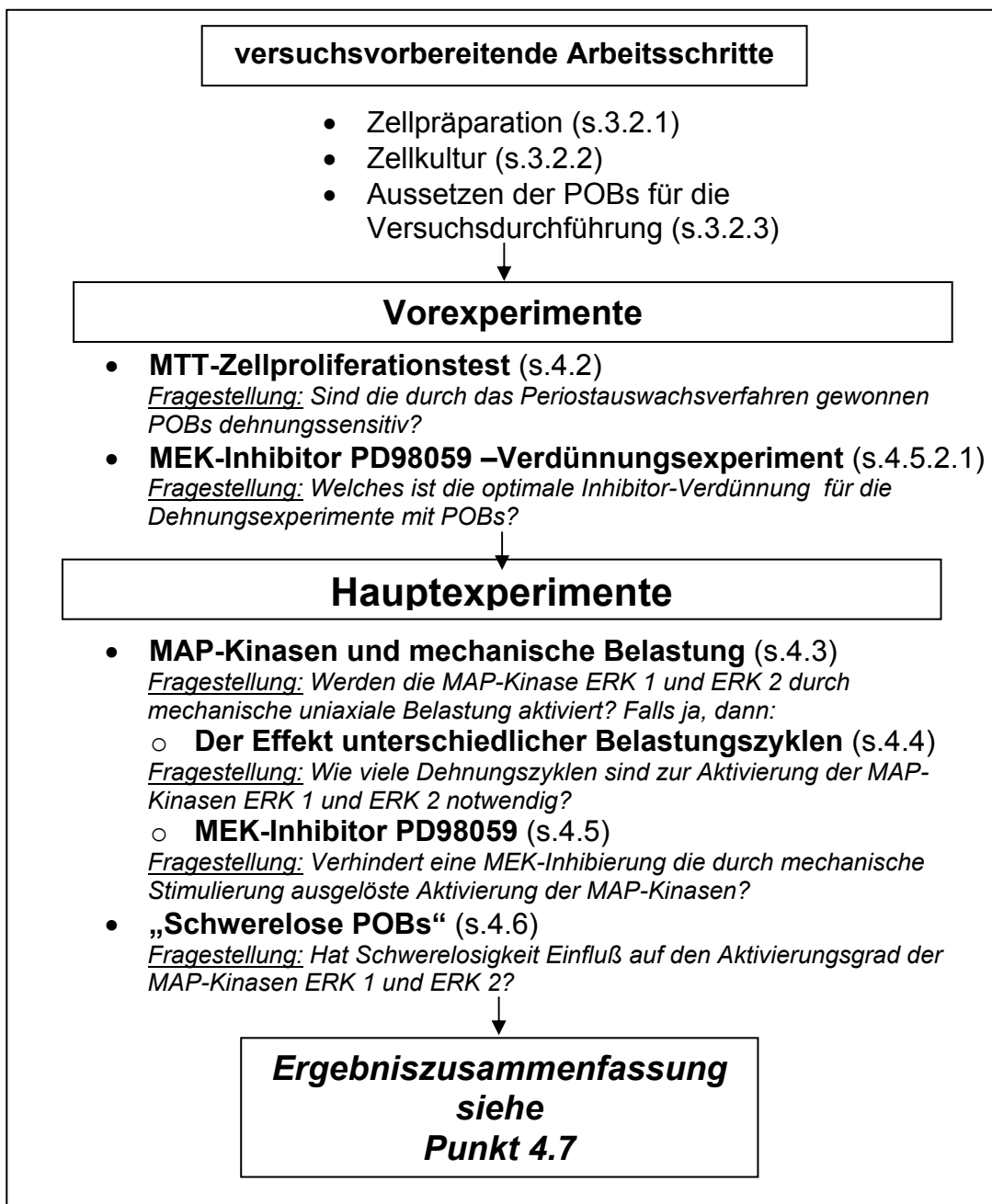


Abb.3.14: An Bord dieses Airbus A300 wurden im Sommer '99 die Parabelflüge über dem Atlantischen Ozean durchgeführt.

4 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an primären bovinen Osteoblasten nach mechanischer uniaxialer Dehnung unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses auf die Aktivierung der Mitogen-Activated-Protein-Kinases (MAP-Kinasen) ERK1 und ERK2 durchgeführt. Unter 4.1 findet sich eine kurze Auflistung des Arbeitsablaufes und der durchgeführten Experimente, die im folgenden ausführlich beschrieben werden.

4.1 Schema des Arbeitsablaufes



4.2 MTT-Zellproliferationsassay

4.2.1 Versuchsbeschreibung MTT-Test

Mit Hilfe des unter 3.3.4 beschriebenen MTT-Zellproliferationstests nach Mosmann ist es möglich, durch einfache photometrische Messungen die Stoffwechselaktivität von Zellen zu bestimmen, zu vergleichen und Rückschlüsse auf die Proliferationsrate ziehen zu können (Mosmann, 1983). Im vorliegenden Versuch sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob definierte mechanische Belastung einen Einfluß auf die Stoffwechselaktivität der, für diese Arbeit verwendeten, POB's hat. Als Nullhypothese (H_0) wurde gefordert, dass mechanische Belastung keinen Einfluß hat, also die Zellen nicht mechanosensibel reagieren. Als Gegenhypothese (H_1) galt die erwartete Mechanosensibilität der Zellen. Die Zellen wurden in üblicher Weise in den vorbereiteten 9-Well-Platten in einer Konzentration von 60000 Zellen/cm² ausgesät. An den zwei folgenden Tagen erfolgten, nach Kontrolle des Anwachsverhaltens, die Belastungszyklen mit 4000 μ strain, 30x mit einer Frequenz von 1 Hz. Die Negativkontrollen wurden identisch behandelt, allerdings nicht belastet. Am vierten Tag erfolgte die photometrische Auswertung. Siehe dazu Punkt 3.3.4.

4.2.2 Ergebnisse

Die Extinktionswerte bei 580 nm der 18 Positiv- und 18 Negativkontrollen werden jeweils in einer nach Rangzahlen geordneten, aufsteigend sortierten Messreihe aufgelistet. Hieraus resultieren die Rangsummen R_x und R_y . Mit dem U-Test von Mann-Whitney kann nun ein unterer und ein oberer kritischer Wert berechnet werden, um eine Aussage über die statistische Signifikanz der Werte treffen zu können. Liegt der ermittelte teststatistische Wert T über der oberen kritischen Grenze (kritische Grenze für zweiseitigen Test $\alpha=0,05$), so wird die Nullhypothese verworfen und H_1 angenommen.

belastete Zellen	Rangzahl bel.	unbel. Zellen	Rangzahl unbel.
0,210	8	0,155	1
0,233	15	0,175	2
0,239	19	0,182	3
0,244	20,5	0,187	4
0,253	23,5	0,196	5
0,253	23,5	0,203	6
0,255	25	0,205	7
0,256	26	0,213	9,5
0,258	27	0,213	9,5
0,260	28	0,215	11
0,273	29,5	0,218	12
0,273	29,5	0,219	13
0,281	31	0,225	14
0,288	32	0,234	16
0,295	33	0,235	17
0,304	34	0,238	18
0,316	35	0,244	20,5
0,328	36	0,248	22

Tabelle 4.1: Extinktionswerte der Positiv- und der Negativkontrollen mit den zugehörigen Rangzahlen.

Die Rangsumme der belasteten Proben ergibt $R_x = 475,5$, die der Negativkontrollen $R_y = 190,5$.

$$T = R_x - n \cdot (n+1) / 2 \quad n = \text{Anzahl der Werte}$$

$$T = 475,5 - 18 \cdot (18+1) / 2$$

$$T = 304,5$$

$$\text{unterer kritischer Wert} = 99$$

$$\text{oberer kritischer Wert} = 225$$

Da T mit 304,5 größer ist als der obere kritische Wert, wird H_1 angenommen, d.h. es kommt durch mechanische Belastung zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Stoffwechselaktivität der POB's um **26,7%** im Vergleich zu den unbelasteten Negativkontrollen.

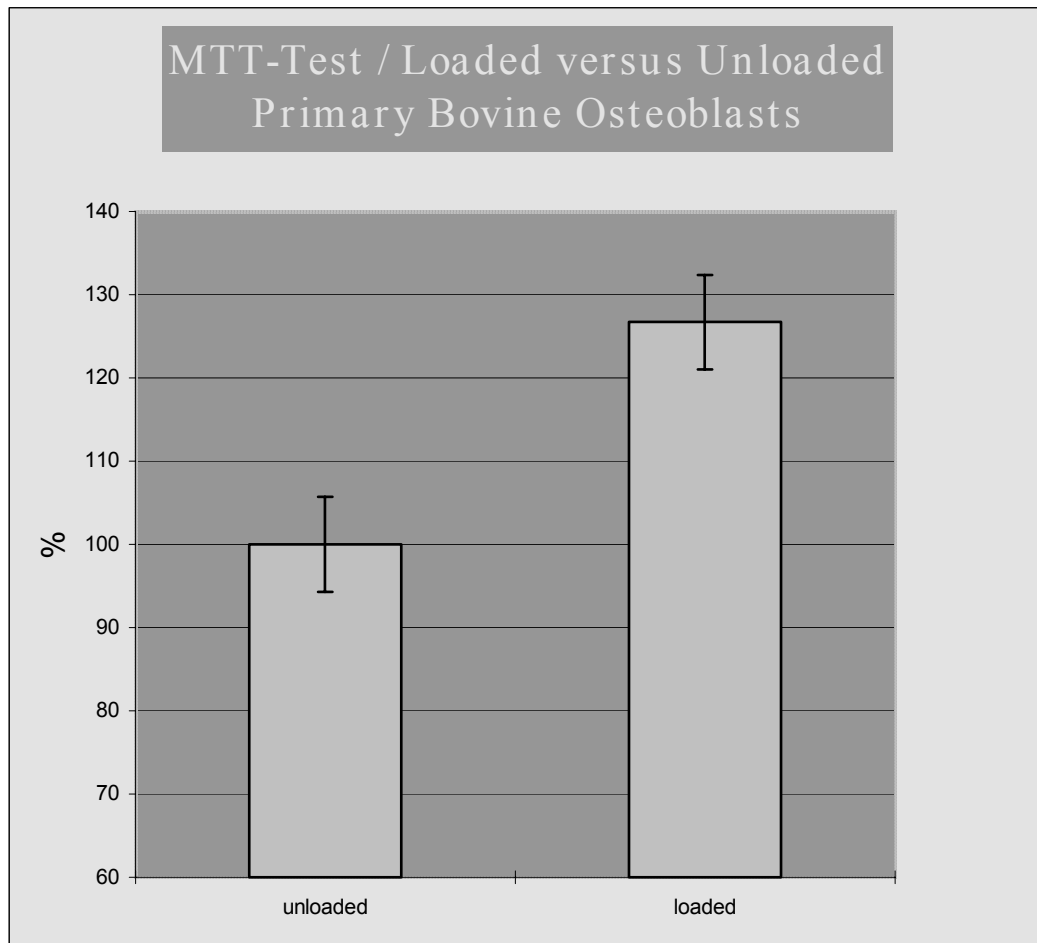


Abb.4.1: Zunahme des Aktivierungsgrades von POB's nach mechanischer Belastung um 26,7 %. Bedingungen dieses Experimentes: Tag 1: Aussäen der Zellen, Tag 2 und 3: Belastung mit 4000 μ strain/30x/1Hz. Tag 4: Auswertung

4.3 Stimulierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 durch mechanische Belastung

4.3.1 Versuchsbeschreibung

Ziel dieses Versuches war es, die Aktivität der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 in Abhängigkeit von mechanischer Belastung bei unterschiedlichen Inkubationszeiten zu untersuchen. Die Untersuchung dieses Enzymes lag nahe, da es bekanntermaßen in mechanisch stimulierten Endothelzellen (Seko et al., 1999; Takahashi et al., 1997), in Herzmyozyten (Seko et al., 1999), sowie auch in Chondrozyten (Hung et al., 2000) zu einem Anstieg der aktivierten Form der MAP-Kinasen (ERK1 und ERK2) kommt.

Nachdem durch Kultivierung von Perioststückchen aus Rinderknochen in Petrischalen unter Verwendung von HighGrowth Medium (inklusive Penicillin, Streptomycin, Glutamin und 10% FCS) nach ca. 4-6 Wochen ein konfluenter Bewuchs der Platten mit Osteoblasten erreicht werden konnte, wurden diese mit Collagenase abgelöst und auf Polycarbonat-Dehnungsschälchen mit einer Konzentration von 60.000 Zellen/cm² erneut ausgesetzt. Zum Anwachsen wurde Ham's F10 Medium, wiederum mit Penicillin, Streptomycin, Glutamin und FCS 10%ig verwandt, da die Zellen ohne FCS nicht an den Platten anwachsen würden. EGF führt zu einer Aktivierung der MAP-Kinase, was eine Untersuchung des Einflusses einer mechanischen Belastung auf die Aktivität der MAP-Kinasen deutlich erschweren würde. Daher erfolgte 24h vor Versuchsdurchführung, nach Sichtkontrolle des Anwachsverhaltens der Zellen, ein Mediumwechsel mit FCS freiem Ham's F10 Medium.

Am Versuchstag wurde zur Herstellung der Positiv-Kontrolle das Medium einer Platte mit EGF (MAP-Kinase-aktivierender Wachstumsfaktor, 50ng/ml) versetzt und 20min im Inkubator inkubiert. Parallel dazu wurden die anderen Platten mit 4000µstain 30mal mit 1Hz auf der „four-point-bending Maschine“ gedehnt und im Anschluss daran unterschiedlichen Inkubationszeiten ausgesetzt, um zu bestimmen, ob und ab welchen Zeiten nach einer erfolgten Dehnung die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 in den POB's aktiviert werden würden. Dazu wurden für diesen Versuch folgende Inkubationszeiten gewählt: 30sec, 1min, 2min, 7min und 20 min. Jeweils nach Abschluss der Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und die Proteinmenge des Lysates bestimmt. Eine Probe wurde ungedehnt zur Herstellung der Negativ-Kontrolle lysiert.

Die so erhaltenen Proteinlysate wurden in gleichen Mengen in die Kammern eines 10%igen SDS-PAGE-Gels nach entsprechender Vorbereitung und Behandlung zusammen mit einem Proteinstandard aufgetragen (60µg/Geltasche). Nach Beendigung der Elektrophorese und Durchführung des Westernblots auf eine PVDF-Blotmembran wurde diese nach dem Blockierungsvorgang (mit BSA Fraction V) und diversen

Waschschritten mit dem Primärantikörper Anti-activated-MAP-Kinase ERK1 und ERK2 in einer Konzentration von 1:15.000 inkubiert, mehrfach gewaschen, mit dem Anti-mouse AP-konjugiertem Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:1.500 inkubiert, wiederum gewaschen und zuletzt durch den colorimetrischen Nachweis mit BCIP/NBT gefärbt.

4.3.2 Ergebnisse Dehnung

4.3.2.1 SDS-PAGE 10%ig (Coomassie-Färbung)

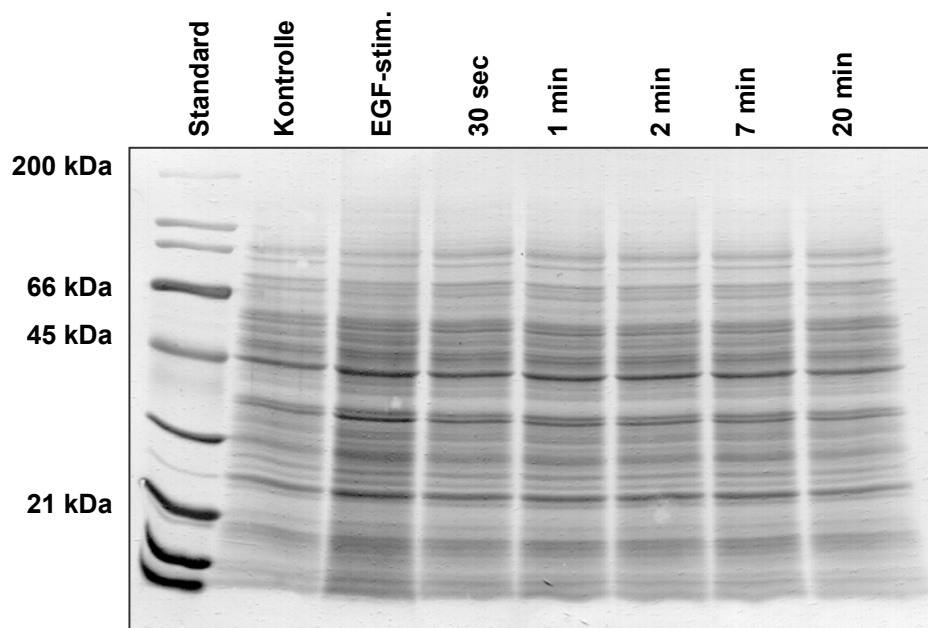


Abb. 4.2: Coomassie-Gelfärbung zum Nachweis einer homogenen Proteinbeladung. 60µg Protein aus dem Lysat gedehnter primärer Osteoblasten wurden nach den aufgeführten Inkubationszeiten in einer 10%igen PAGE für den anschließenden Westernblot separiert. Zu erkennen ist eine homogene Proteinbeladung der Proben. Die Positivkontrolle ist gering stärker beladen. Am äußerst linken Rand befindet sich der Proteinstandard.

4.3.2.2 Immunoblot

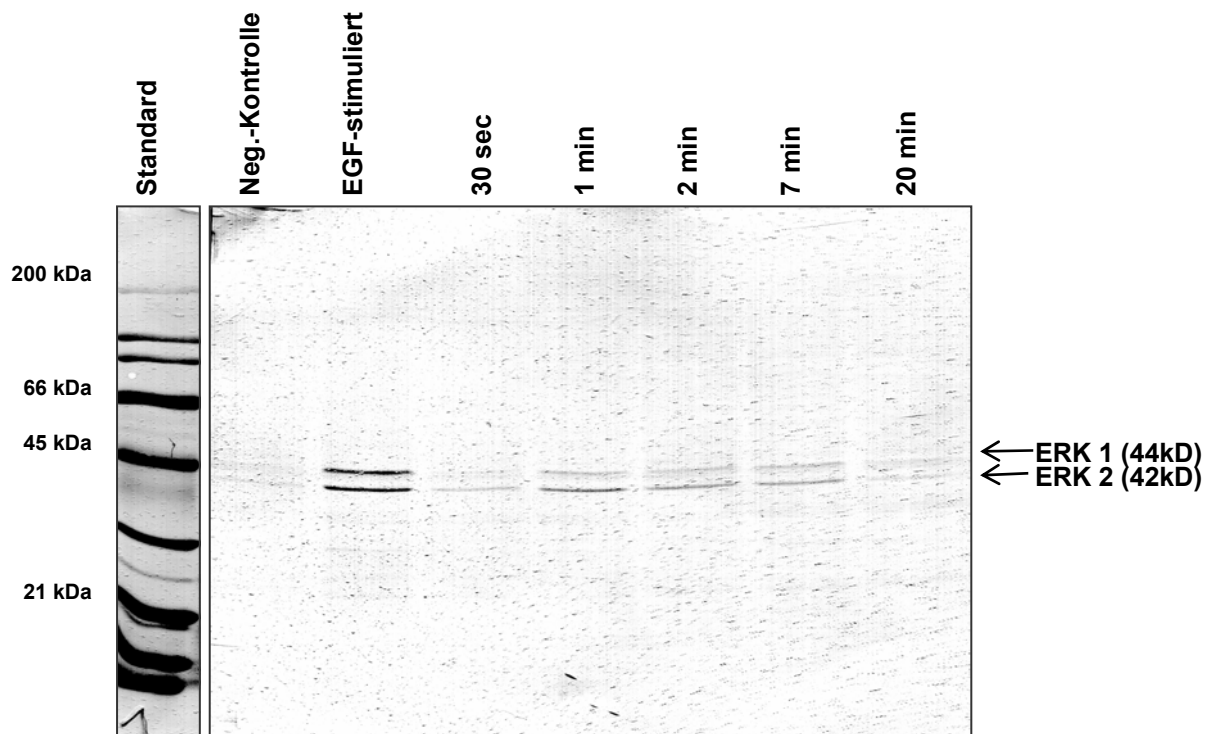


Abb.4.3: PVDF-Membran nach dem colorimetrischen Nachweis des Alkalische Phosphatase-konjugierten Sekundärantikörpers

Auf Abb.4.3 ist nach erfolgtem Westernblot und anschließendem immunhistochemischen Nachweis der aktivierten Form der MAP-Kinasen (ERK1 und ERK2) diese in Abhängigkeit der Inkubationszeit in unterschiedlichen Aktivierungsgraden nachweisbar. Zu erkennen ist neben einer fast nicht nachweisbaren Aktivierung der MAP-Kinasen in der Negativkontrolle eine deutliche Positivkontrolle. Bereits 30 Sekunden nach erfolgter Dehnung mit 4000 μ strain kommt es zu einer Aktivitätszunahme der MAP-Kinasen, die über 1,2 und 7 Minuten zunimmt, um bereits nach 20 Minuten wieder deutlich abgeschwächt, also wieder deaktiviert zu sein. Auffällig ist eine stärkere Aktivierung der ERK 2 im Vergleich zu ERK 1.

Dieses Ergebnis wurde im Rahmen dieser Arbeit durch zwei weitere Versuchsreihen mit identischem Versuchsaufbau und Versuchsbedingungen bestätigt. Auch diese Ergebnisse zeigten eine Zunahme der MAP-Kinasen Aktivierung in den ersten 7 Minuten nach

applizierter Dehnung und eine deutliche Signalabschwächung nach 20 Minuten.

Durch Modifikation der Inkubationszeiten nach Dehnung gelang es einem weiteren Doktoranden des Institutes für experimentelle Orthopädie und Biomechanik den Zeitpunkt der maximalen Aktivierung von ERK1 und ERK2 näher einzugrenzen. Für diese insgesamt 8 Versuchsreihen fanden ebenfalls identische Versuchsabläufe Anwendung, jedoch mit Inkubationszeiten nach Dehnung von 30sec, 1min, 2min, 3min, 5min, 10min, 20min und 60min. B. Bromme bestätigte mit seinen Ergebnissen, dass in Abhängigkeit von mechanischer Belastung eine Aktivierung der MAPKinasen ERK 1 und ERK 2 stattfindet, wobei geringe Abweichungen der Zeitspannen bis zur Aktivierung und anschließenden Deaktivierung festzustellen sind. Übereinstimmend zeigte sich jedoch in allen Versuchen eine deutliche Aktivierung der MAPKinasen ERK1 und ERK2 in einem Zeitraum von ca. 2-10 Minuten nach mechanischer Belastung mit einem Freisetzungsmaximum nach ca. 5 Minuten und eine anschließende Deaktivierung derselben (Bromme and Jones D.B., 2000). In allen Kontrollexperimenten bestätigte sich die vermehrte Aktivierung von ERK 2 im Vergleich zu ERK 1.

4.4 Einmalige Belastung aktiviert MAP-Kinasen

4.4.1 Versuchsbeschreibung

Aufgrund der Ergebnisse, die eine Aktivierung der MAP-Kinasen-Isoenzyme ERK 1 und ERK 2 ca. 1-10 Minuten nach mechanischer Belastung mit 4000 μ strain, 1Hz und 30 Dehnungen zeigten, stellte sich nun die Frage nach der minimal notwendigen Dehnungsanzahl, die zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen führen würde. Hierzu wurden die Zellen in gewohnter Weise kultiviert, ausgesät und nach Sichtkontrolle des Anwachsverhaltens wiederum 24h in FCS freiem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen unterschiedlichen Belastungszyklen auf der four-point-bending Maschine ausgesetzt. Die Zyklen wurden von 1x, 5x, 10x, 15x, 20x, 25x bis 30x mit 4000 μ strain mit der Frequenz von 1 Hz gewählt. Anschließend wurden die Zellen jeweils für 7 Minuten im 37°C

Brutschrank inkubiert, da dies eine Zeitspanne ist, in der es, wie aus obigem Versuchen ersichtlich ist, sicher zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen -zumindest bei 30 Zyklen- kommt. Im Anschluß erfolgte die Aufbereitung des Zelllysates, die Gelelektrophorese (50µg Proteinlysate/Geltasche), das Blotting und schließlich die Inkubation mit dem Primär- und Sekundärantikörper. Primärantikörper war wiederum Anti-aktivierte-MAPKinase (ERK1+ERK2) in einer Konzentration von 1:15.000, Sekundärantikörper war Anti-Maus-APconj-AK in einer Konzentration von 1:1.500. Die Banden wurden mit einer NBT und BCIP-Reaktion sichtbar gemacht.

4.4.2 Ergebnisse Dehnungszyklen

4.4.2.1 SDS-PAGE 10%ig (Coomassie-Färbung)

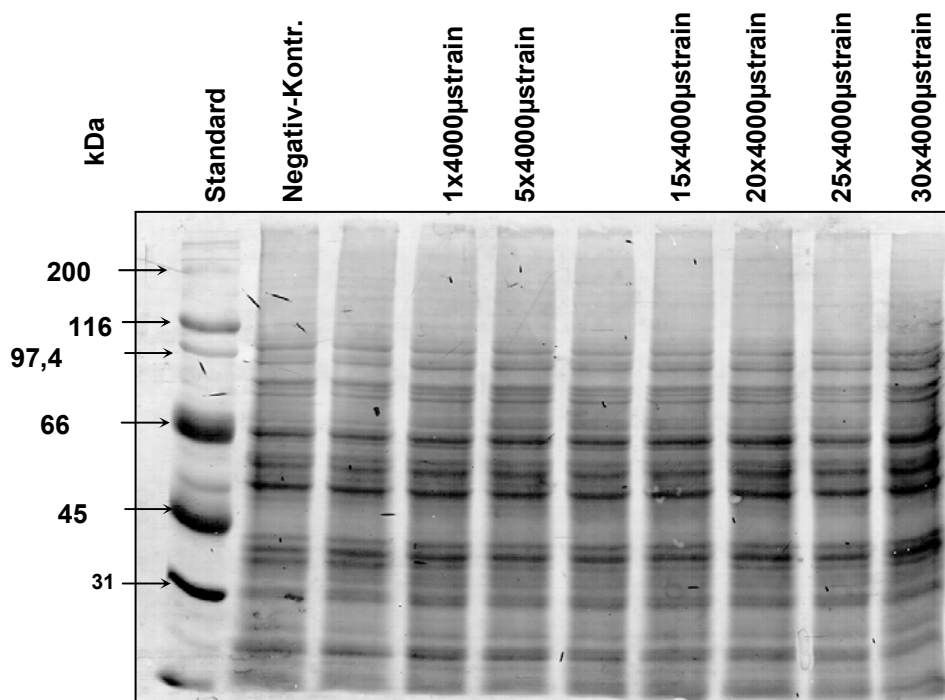


Abb.4.4: Coomassie-Gelfärbung zum Nachweis einer homogenen Proteinbeladung. Durch die nach oben konkav verlaufenden Gelränder kommt es dort zu Unschärfen. Der Westernblot wird hierdurch nicht beeinträchtigt. Äußerst links befindet sich der Proteinstandard, gefolgt von der Negativ- und der Positivkontrolle sowie den unterschiedlichen Dehnungszyklen.

4.4.2.2 Immunoblot

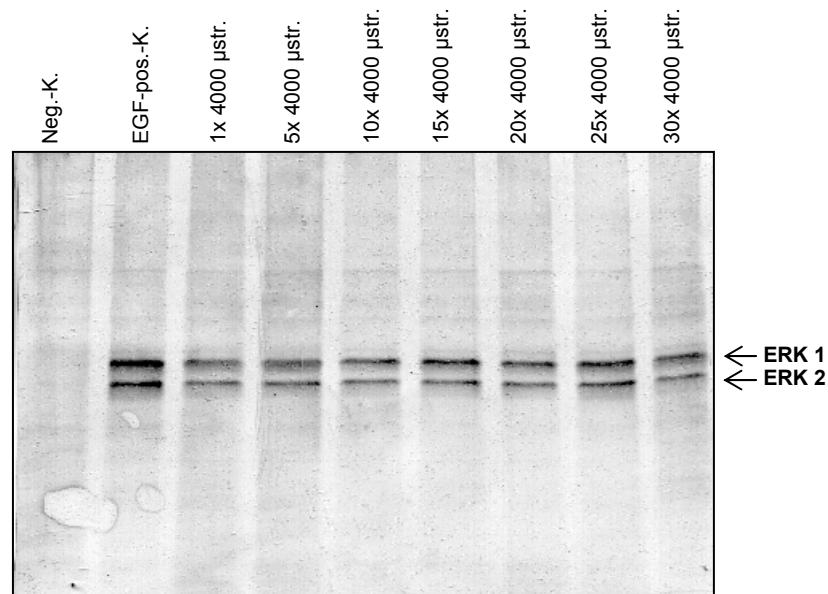


Abb.4.5: PVDF-Membran nach dem colorimetrischen Nachweis des Alkalische Phosphatase-conjugierten Sekundärantikörpers

Auf Abb.4.5 ist bei geringer Hintergrundfärbung neben der ungedehnten Negativkontrolle eine deutliche Positivkontrolle gefolgt von den ebenfalls deutlich positiven Signalen der Proben zu erkennen. Aus obigem Ergebnis folgt, ebenso wie aus einem weiteren, dieses Ergebnis bestätigenden Kontrollversuch, die Feststellung, dass eine einmalige mechanische Belastung der Proben mit 4000 μ strain auf der four-point-bending-Maschine ausreicht, um die MAP-Kinasen (ERK1&ERK2) in primären bovinen Osteoblasten zu aktivieren.

Aus Gründen der Vergleichbarkeit, der Homogenität der Versuchsbedingungen und aufgrund des nachgewiesenen hohen Proliferationszuwachses der Zellen, wurden allerdings auch die folgenden Experimente weiterhin mit einer Belastung von 30x4000 μ strain durchgeführt.

4.5 MEK-Inhibitor PD98059 verhindert Aktivierung der MAP-Kinasen

4.5.1 Versuchsbeschreibung

Dass die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 durch mechanische Belastung aktiviert werden, konnte mehrfach in unserem Labor (s.o.) reproduziert werden. Um nun genauere Rückschlüsse auf den Prozess von der Belastung über die Aktivierung der MAPKinase bis hin zur Stimulierung der Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten zu untersuchen, wurde ein Inhibitor eingesetzt, der einen Teil des bekannten Ras/Raf-pathways inhibiert, nämlich die MAPKinase-Kinase (MEK). Dieser Inhibitor (PD98059) blockiert die downstream-Regulierung der MAPKinasen nach Einfluss von Wachstumshormonen auf die Zelle.

Interessant war die Frage, ob die, durch mechanische Belastung nachgewiesene Aktivierung der MAP-Kinasen, nun durch eine Blockierung innerhalb dieses Stoffwechselweges ausbleiben, oder ob trotz Blockierung des unmittelbar zuvor stattfindenden Stoffwechselschrittes eine Aktivierung der MAP-Kinasen durch mechanische Belastung auf anderen Wegen erfolgen würde.

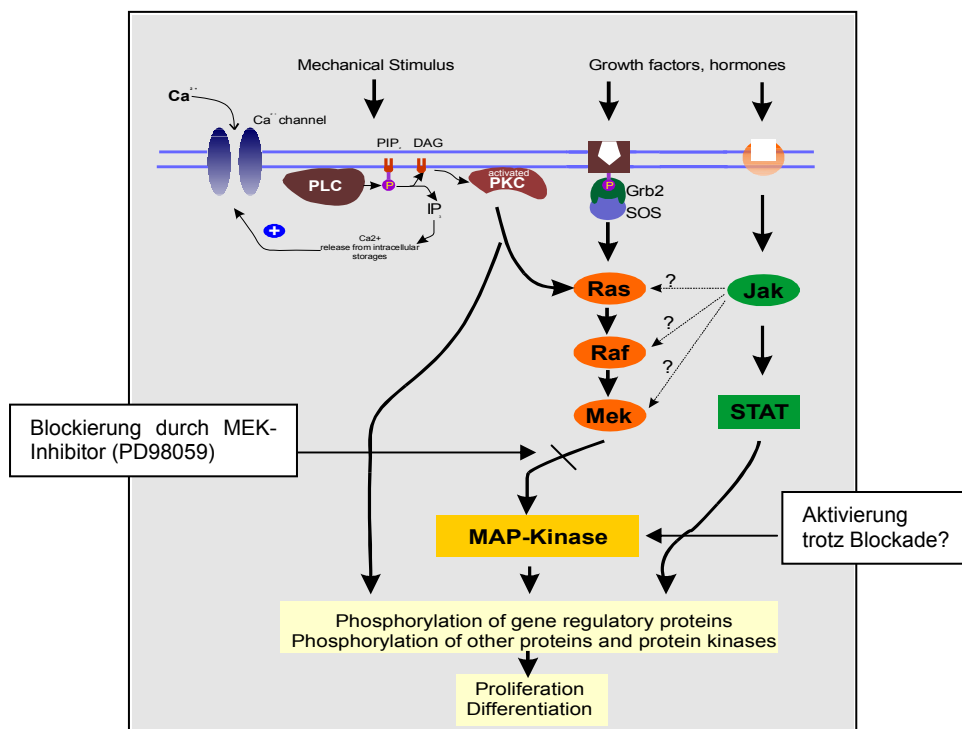


Abb.4.6: Der Ras/Raf pathway als Teil der Signaltransduktion, auch Teil der Mechanotransduktion?

In einem Vorversuch wurde zuvor die optimale Konzentration des Inhibitors PD98059 ermittelt. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt von 5 μ Mol, 10 μ Mol, 15 μ Mol, 20mMol, 25 μ Mol bis 30 μ Mol. Diese Konzentrationen wurden den FCS freien Medien hinzugegeben, nachdem die Zellen für 24h in diesen inkubiert wurden. Bezugnehmend auf einen Artikel von J.Reiners wurden die Zellen nun für 22h mit diesem Inhibitor in den unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert (Reiners, Jr. et al., 1998). Die Zellen wurden anschließend mit 50ng/ml EGF für 20 Minuten aktiviert. Danach erfolgte die Aufbereitung des Zelllysates für den folgenden Westernblot mit anti-aktivierte-MAPKinase-AK als Primär-Antikörper und anti-Maus-APconj-AK als Sekundär-Antikörper.

Daran anschließend erfolgte nun der Belastungsversuch, bei dem die Zellen der zuvor ermittelten Inhibitorkonzentration von 15 μ Mol für 22h ausgesetzt und dann mit 4000 μ strain auf der four-point-bending Maschine 30x unter 1Hz belastet wurden, mit anschließender Inkubationszeit von 2min, 5min, 7min und 10min. Parallel dazu wurden eine EGF-stimulierte Positivkontrolle, eine EGF-stimulierte mit MEK-Inhibitor versehene Positivkontrolle und eine ungedehnte Negativkontrolle hergestellt. Sämtliche Lysate wurden in gewohnter Weise für den Westernblot aufbereitet und anschließend mit den Antikörpern inkubiert.

4.5.2 Ergebnisse MEK-Inhibitor

4.5.2.1 MEK-Inhibitor Verdünnungs-Vorversuch

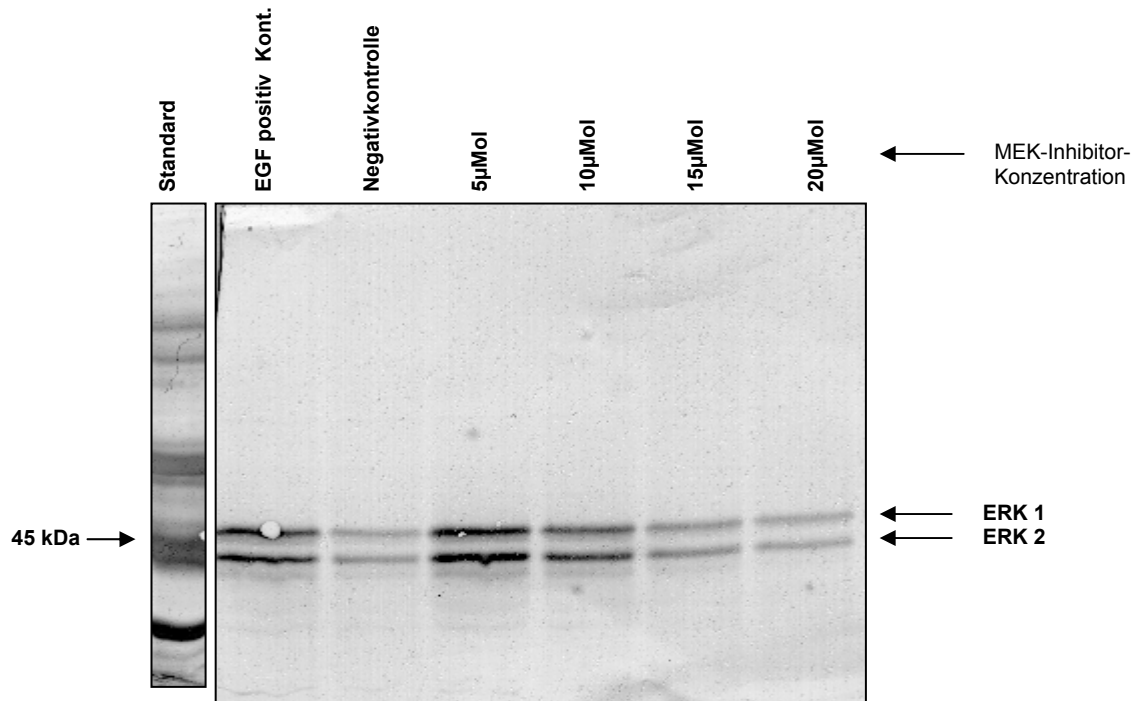


Abb.4.7: Immunoblot zur Bestimmung der optimalen MEK-Inhibitor-Konzentration als Vorversuch zum Dehnungs-experiment. Zur Aktivierung wurde EGF in einer Konzentration von 50ng/ml verwandt.

Auf dem Immunoblot der Abb. 4.7 ist in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration die erwartete abnehmende MAP-Kinasen Aktivität neben der Positiv- und der deutlich geringer aktiven Negativkontrolle zu erkennen. Ab einer Konzentration von 20µMol erreicht die Aktivität der MAP-Kinasen die der ungedehnten Negativ-Kontrolle. Die Sichtkontrolle vor Versuchsbeginn zeigte allerdings zytotoxische Effekte dieser Inhibitorkonzentration, so dass das folgende Inhibitorexperiment mit einer PD98056-Konzentration von 15µMol durchgeführt wurde.

4.5.2.2 MEK-Inhibitor-Experiment - SDS-PAGE 10%ig (Coomassie-Färbung)

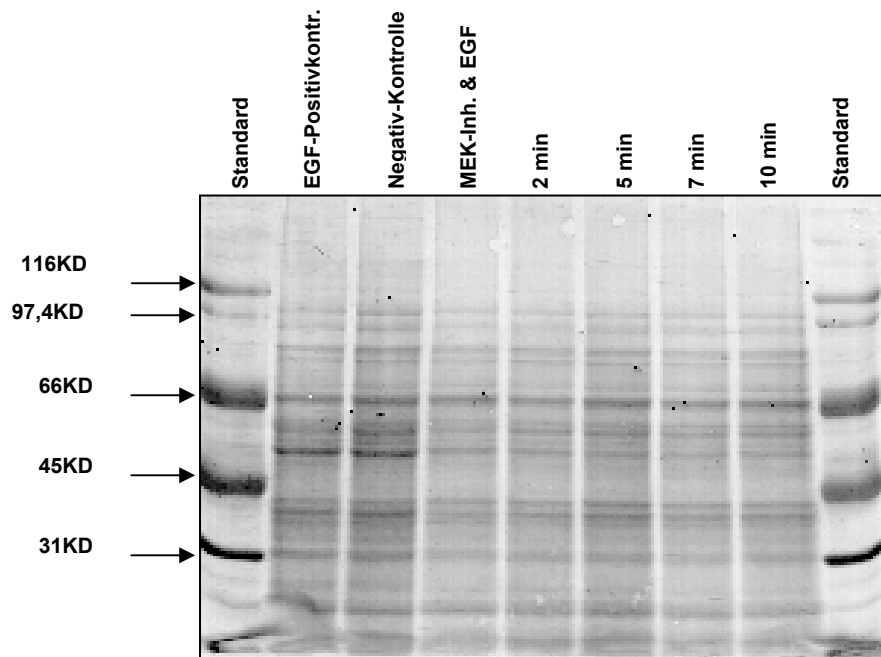


Abb.4.8: Coomassie-Färbung des 10%igen homogenen Trenngels nach Laemmli zur Kontrolle einer homogenen Proteinbeladung der Proben vor anschließendem Westernblot.

4.5.2.3 Immunoblot

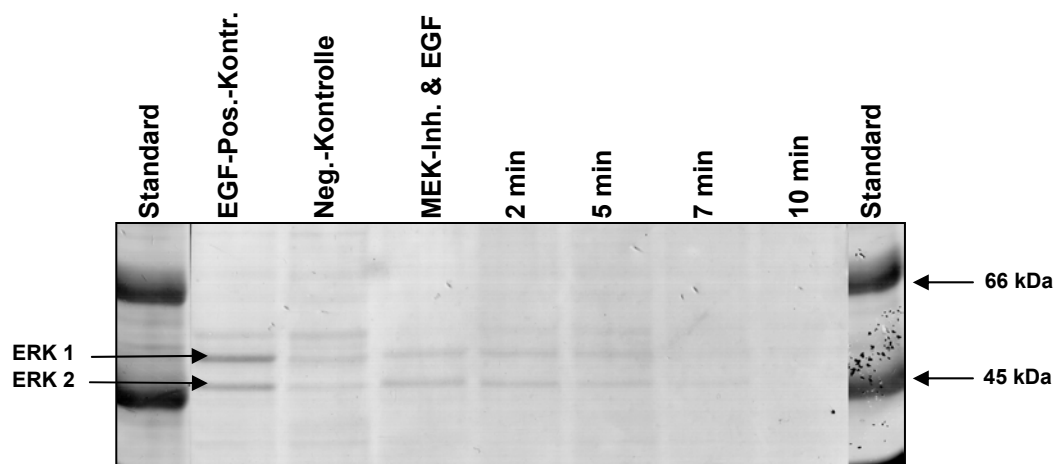


Abb.4.9: Immunoblot der unterschiedlichen Inkubationszeiten nach Blockierung von MEK mit 15µMol PD98056 und anschließender Dehnung mit 30x4000µstrain.

Auf Abb. 4.9 sind deutlich aktivierte ERK 1- und ERK 2- Banden als EGF-stimulierte Positivkontrolle neben deutlich minder aktivierter Negativkontrolle und gering stärker ausgeprägten Banden bei der mit MEK-Inhibitor vorinkubierten EGF-Kontrolle zu erkennen. Der Aktivierungsgrad der gedehnten Proben nimmt kontinuierlich von 2 Minuten bis hin zu 10 Minuten ab, ist bei 2 Minuten Inkubationszeit nach Belastung mit 4000 μ strain 30x mit 1Hz gering stärker als die ungedehnte Negativkontrolle, erreicht aber bei weitem nicht die Stärke der Positivkontrolle. Bei 10 Minuten ist ein Signal allenfalls noch zu erahnen. Auch dieses Ergebnis wurde in Kontrollversuchen bestätigt. Folglich ist hiermit bewiesen, dass die in vorhergehenden Versuchen festgestellte Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 nach mechanischer Belastung durch eine Phosphorylierung der im Ras/Raf-Pathway vorgeschalteten MAPK-Kinase (MEK) stattfindet.

4.6 Einfluß der Schwerelosigkeit auf MAP-Kinasen

4.6.1 Versuchsbeschreibung

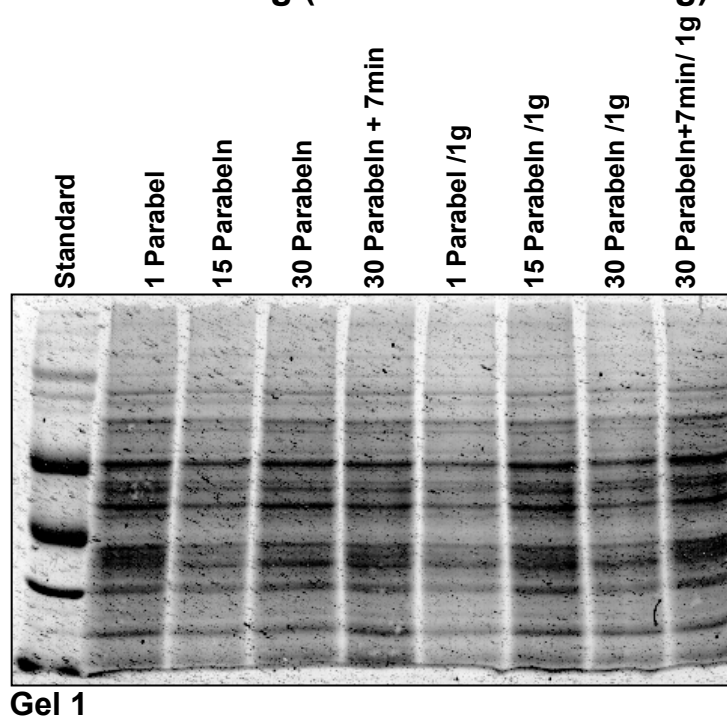
Ziel dieses Experimentes war es, die in vorherigen Versuchen in unserem Labor nachgewiesene, durch mechanische Belastung ausgelöste Aktivierung der MAP-Kinasen ERK 1 und ERK 2 unter den Bedingungen der Schwerelosigkeit zu überprüfen. Hierzu wuchsen die POBs in speziellen Kulturschalen an, die am Versuchstag in eine an Bord eines Airbus A300 befindliche Zentrifuge eingebracht wurden. In dieser auf 37°C beheizten Zentrifuge befanden sich, neben den an den Zentrifugenarmen angebrachten Negativkontrollen, die der Schwerelosigkeit ausgesetzten Positivkontrollen. Während der, durch Parabelflugmanöver verursachten Schwerelosigkeit, wurden die Zellen, welche sich an den Armen der Zentrifuge befanden, durch Rotation der Zentrifuge weiterhin der normalen Erdbeschleunigung (1xg) ausgesetzt (=Negativkontrolle), während die an dem Rand der Zentrifuge befestigten Zellen in dieser Zeit der Schwerelosigkeit ausgesetzt waren (=Positivkontrolle). Die Dauer der Schwerelosigkeit betrug pro Parabel zwischen 25 und 30 sec (s. Material und Methoden 3.7). Nach der 1., der

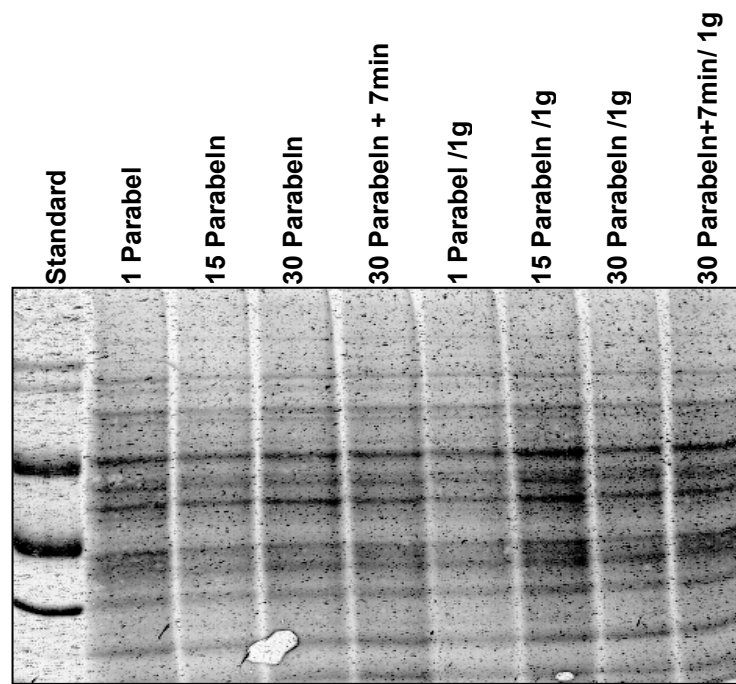
15., der 30. und nach weiteren 7min nach der 30. Parabel wurden jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle der Zentrifuge entnommen und in einer an Bord befindlichen Kühlbox sofort auf eine, den Stoffwechsel der Zellen inhibierende Temperatur abgekühlt. Nach dem Versuch wurden die Zellen in gewohnter Weise behandelt.

In den folgenden Abbildungen sind die Gele und die Westernblots dieser Positiv- und Negativkontrollen zu sehen. Primärantikörper war wiederum der Anti-aktivierte-MAP-Kinase-Antikörper (anti-ERK1 und anti-ERK2) in einer Konzentration von 1:15.000, der Sekundärantikörper erneut Anti-mouse-AK-APconj in einer Konzentration von 1:1500. Da bei der Immunfärbung deutliche Signale als Hinweis einer Aktivierung der MAP-Kinase sowohl bei den Positiv-, wie auch bei den Negativkontrollen ausblieben, wurden die Blots länger als gewöhnlich in der BCIP/NBT-Lösung inkubiert, um doch noch eventuelle signifikante Unterschiede eruieren zu können. Folge hiervon ist die ungewöhnlich hohe Hintergrundfärbung in den Gels/Blots 1 und 2. Um dieses Problem zu umgehen, wurden weitere Westernblots angefertigt, diesmal mit einer EGF-stimulierten und einer ungedehnten Bodenkontrolle (Gele/Blots 3 und 4).

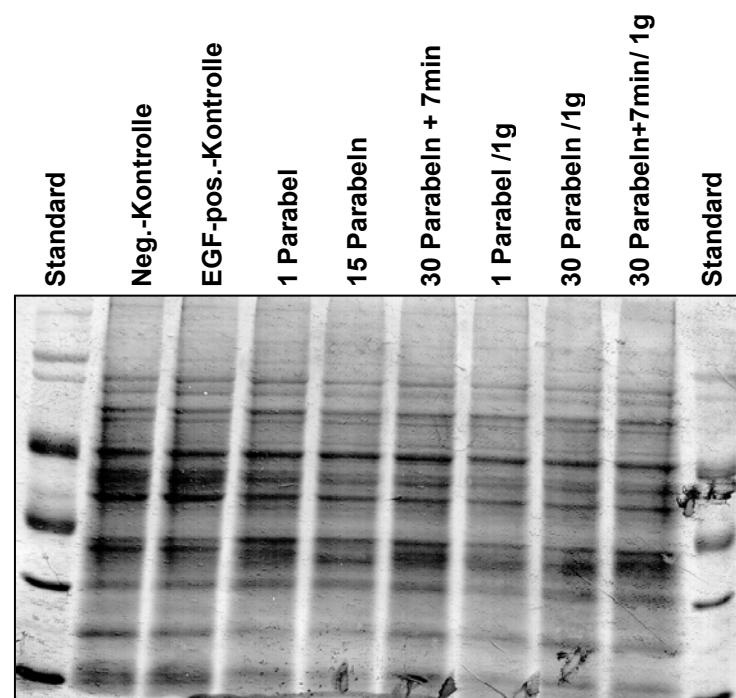
4.6.2 Ergebnisse Schwerelosigkeit

4.6.2.1 SDS-PAGE 10%ig (Coomassie - Färbung)





Gel 2



Gel 3

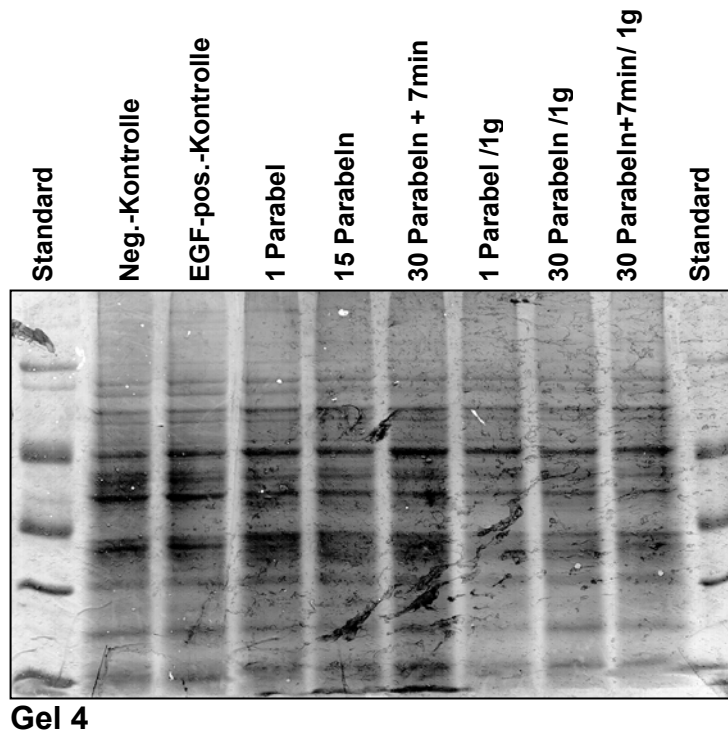
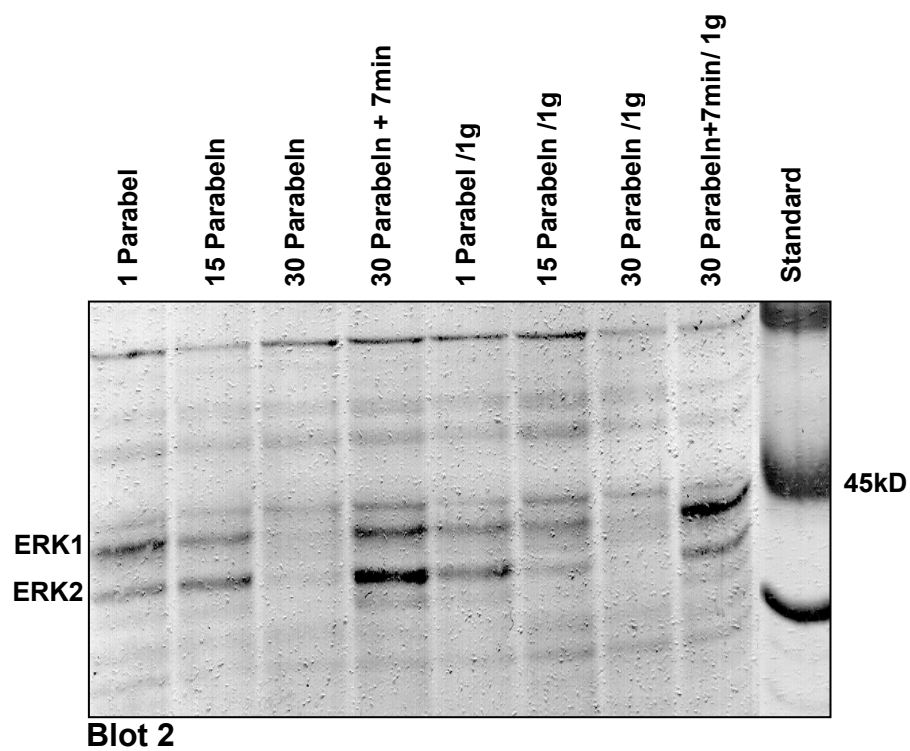
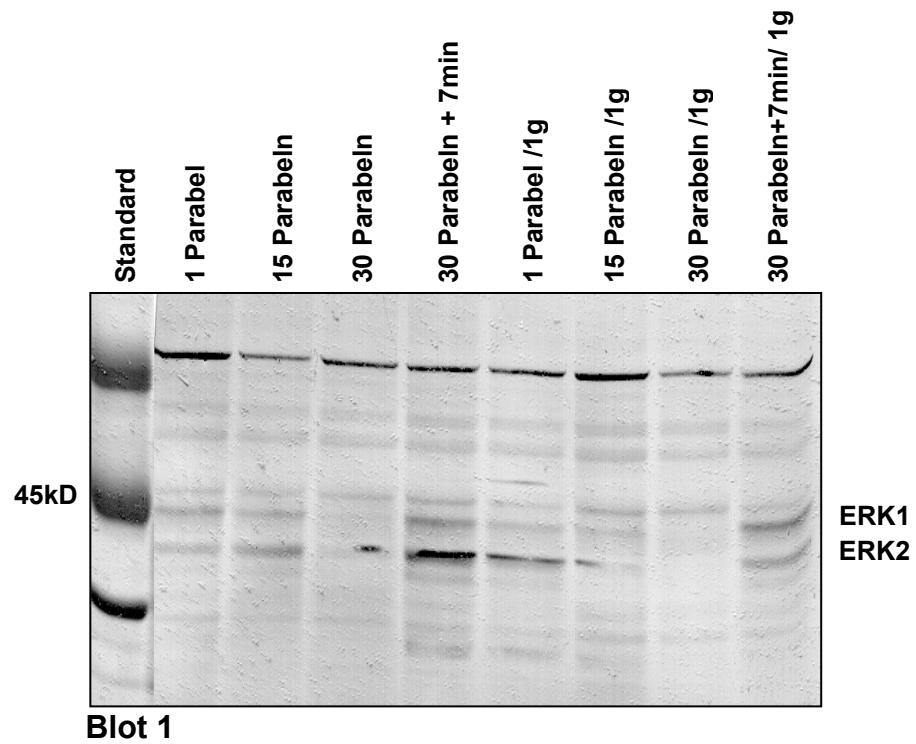


Abb.4.10: Die obigen Abbildungen (Gele 1-4) zeigen die Polyacrylamid-Gele der Proteinlysate der POBs, die durch Parabelflüge der Schwerelosigkeit ausgesetzt wurden. Bei den Kontrollen handelt es sich um während der Phasen der Schwerelosigkeit mittels Zentrifuge auf 1g beschleunigte Negativkontrollen. Nach definierten Zeitpunkten wurde der Stoffwechsel der Zellen durch Abkühlung gestoppt. In Anbetracht der Ergebnisse der Immunoblots gilt besondere Beachtung der Proteinbeladung der Lanes '30 Parabeln', '30Parabeln/1g', '30 Parabeln + 7 min' und '30 Parabeln + 7 min/1g'. Da nur geringe Mengen Probenmaterial zur Verfügung standen, konnten in Gel 3 und 4 nicht identische 0xg-Positiv- und 1xg-Negativkontrollen verwandt werden.

4.6.2.2 Immunoblot



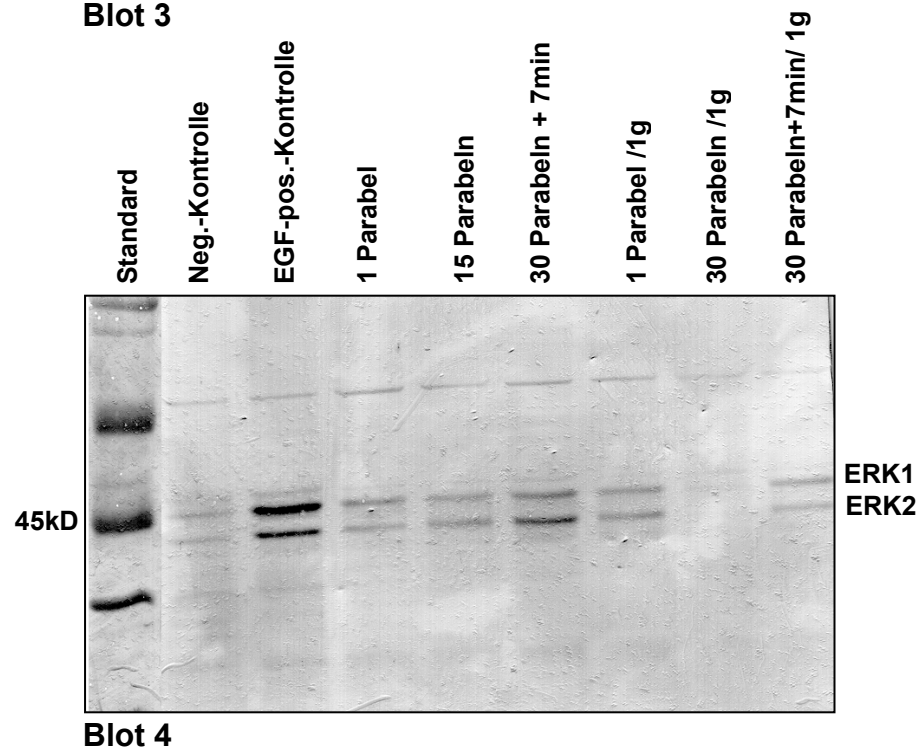
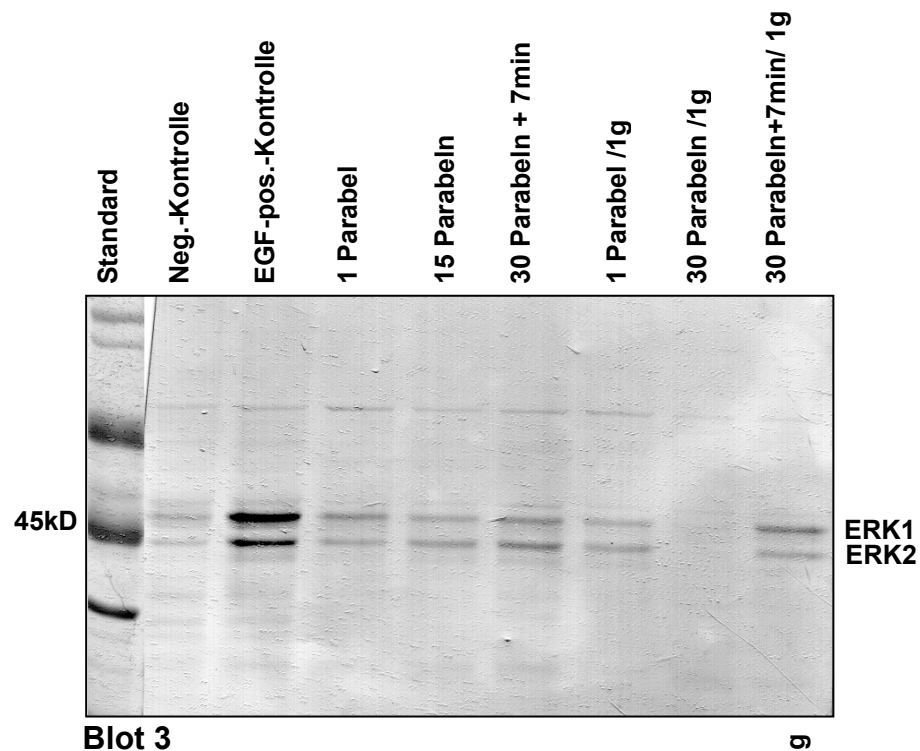


Abb.4.11: Blot 1-4 beinhalten die Immunoblots der Schwerelosigkeits-Proteinlysate. Die ungewöhnlich starke Hintergrundfärbung von Blot 1 und 2 rührt daher, da aufgrund fehlender ungedehnter Negativkontrollen und EGF-stimulierter Positivkontrollen diese Westernblots so lange in NBT/BCIP-Lösung inkubiert wurden, bis die MAPKinase-Banden sichtbar wurden, um eventuelle signifikante Unterschiede zwischen den Proben erkennen zu können. Blots 3 und 4 wurden um eine unbelastete Negativ- und eine EGF-Positivkontrolle ergänzt.

Beschreibung Blot 1 und 2: Bei insgesamt hoher Hintergrundfärbung ist nach der ersten Parabel bei den 0xg-Zellen ein stärkeres ERK1 Signal im Vergleich zum ERK2 Signal nachzuweisen. Bei der 1xg-Kontrolle entspricht das Verhältnis dem der mechanischen Belastung, nämlich $ERK2 > ERK1$. Nach der 15. Parabel hat sich das Verhältnis umgekehrt. Jetzt ist das ERK2 Signal der 0xg-Zellen stärker als das ERK1 Signal, vice versa bei den 0xg-Kontrollzellen. Interessanterweise liegt in beiden Gruppen eine fast vollständige Supprimierung der Aktivität der MAPKinasen nach der letzten Parabel, gefolgt von einer erneuten Aktivierung nach weiteren 7 Minuten nach dem letzten Parabelflugmanöver vor. Auch hierbei ist ein unterschiedliches Aktivierungsmuster beider Gruppen nachzuweisen: in den Schwerelosigkeitsproben ist weiterhin $ERK2 > ERK1$, während in den Kontrollzellen $ERK1 > ERK2$ ist.

Beschreibung Blot 3 und 4: Unter Verwendung einer EGF-stimulierten Positivkontrolle wurde der colorimetrische Proteinnachweis mit BCIP/NBT bei deutlicher Färbung der Positivbanden abgestoppt. Hierdurch fiel die im vorhergehenden Versuch aufgetretene Hintergrundfärbung deutlich geringer aus. Zu erkennen sind gut sichtbare EGF-Positivbanden neben fast nicht sichtbaren Negativkontroll-Banden. Auch in diesen Immunoblots sind nach der 30. Parabel keine aktivierten ERKs nachzuweisen. Nach weiteren 7 Minuten sind allerdings auch hier wieder deutliche Aktivierungssignale vorhanden. Das Aktivierungsmuster der Proben entspricht dem der Blots 1 und 2.

4.7 Ergebniszusammenfassung

- Mit Hilfe des MTT-Zellproliferationsassays konnte die Mechano-sensibilität, der durch das Periostauswachsverfahren gewonnenen, primären bovinen Osteoblasten bewiesen werden. Statistisch signifikant stieg nach einer mechanischen Stimulierung mit 30 Belastungen á 4000 μ strain an zwei aufeinander folgenden Tagen die Aktivität der gedehnten Zellen im Vergleich zur ungedehnten Kontrollgruppe um 26,7% an.
- Durch uniaxiale Dehnung mit 4000 μ strain und 30Zyklen mit 1 Hz auf der 4-Punkt-Dehnungsmaschine kommt es innerhalb eines Zeitraumes von 2-10min zu einer Aktivierung von ERK1 und ERK2, wobei die Aktivierung von ERK 2 größer ist, als die von ERK 1. Ein Aktivierungsmaximum liegt nach ca. 5 Minuten vor.
- Eine Stimulierung der POBs mit nur einem Zyklus mit 4000 μ strain auf der 4-Punkt-Dehnungsmaschine aktiviert die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 in gleichem Maße wie 30 Dehnungszyklen.
- Der MEK-Inhibitor PD98059 verhindert die mechano-induzierte Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2.
- Schwerelosigkeit übt Einfluß auf die Aktivität und das Aktivierungsmuster der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 aus. Das Verhältnis der ERK1/ERK2 – Aktivierung verhält sich in den 0xg – und 1xg – Gruppen gegenläufig. Nach 30 Parabeln kommt es sowohl in der 0xg – Positiv -, wie auch in der 1xg – Negativkontrolle zu einer vollständigen Supprimierung des MAP-Kinasen Signals, nach weiteren 7 min Inkubationszeit zu einem erneuten Signal.

5. Diskussion

Obwohl die Mechanotransduktion seit vielen Jahren Gegenstand aufwendiger Forschungsbemühungen ist, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt weder der Stimulus, auf welchen die Osteoblasten reagieren, seien es „shear stress“, strömende Potentiale, die direkte mechanische Deformierung der Zelle selbst, magnetische Felder oder ähnliches, noch der genaue intrazelluläre Weg der Mechanotransduktion definitiv bekannt.

Die mit dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse bringen neue Erkenntnisse im Bereich der Mechanotransduktion in primären bovinen Osteoblasten. Möglicherweise leisten diese Erkenntnisse einen Beitrag zu einer weiteren Charakterisierung der Mechanotransduktion.

Unabhängig davon, auf welche Art und Weise das mechanische Signal die Zelle erreicht, bzw. von der Zelle perzeptiert wird, führt das Signal zu einer biochemischen Reaktion der Osteoblasten in Form von Proliferation und Differenzierung. Dies konnte eindrucksvoll mit Hilfe des MTT-Zellproliferationsassays nach Mosmann (Mosmann, 1983) bewiesen werden (s.4.2). Eine uniaxiale Belastung der kultivierten POB's mit 4000 μ str, 30Zyklen mit 1Hz auf der 4-point-bending-Maschine an zwei aufeinanderfolgenden Tagen führte zu einer statistisch signifikanten Steigerung der Stoffwechselaktivität/Proliferation der Zellen um 26,7% im Vergleich zur unbelasteten Negativkontrolle. Hiermit war der Beweis für die Mechanosensibilität der, nach dem Periostauswachsverfahren kultivierten, POB's erbracht.

Es gibt zwar, mit ca. 20 bekannten, nur eine relativ geringe Anzahl intrazellulärer Stoffwechsel- und Signalkaskaden (z.B. second-messenger, Proteinkinasekaskaden), aber aufgrund möglichen, stattfindenden Interaktionen zwischen den verschiedenen Signaltransduktionswegen, wird die Signal- und Mechanotransduktion komplex und schwer verständlich.

Takahashi, Hung und Sadoshima wiesen eine Beteiligung der MAPKinasen an der Mechanotransduktion in mechanosensiblen Herzmyozyten, Chondrozyten und Endothelzellen nach (Hung et al., 2000; Sadoshima and Izumo, 1993; Seko et al., 1999). Interessant war zu untersuchen, ob dies auch auf mechanosensible Osteoblasten übertragbar ist, d.h., ob es auch bei den POB's zu einer Aktivierung der MAPKinasen ERK1 und ERK2 nach mechanischer Belastung kommen würde. Mittels Immunoblotverfahren mit einem monoklonalen Antikörper gegen die aktivierte (=phosphorylierte) Form der MAPKinase-Isoformen ERK1 und ERK2 konnte dies mit dieser Arbeit erstmals dargestellt werden. Später gelang auch Jessop et al. der Nachweis einer ERK-Aktivierung in mechanisch belasteten Osteoblasten (ROS) (Jessop et al., 2001). Aus einer uniaxialen Dehnung der primären bovinen Osteoblasten mit 4000 μ strain, 30 Zyklen bei 1Hz resultiert in unseren Experimenten innerhalb weniger Minuten eine deutliche Aktivitätssteigerung von ERK1 und ERK2, wobei die Signalintensität von ERK2 stets größer ist als die von ERK1.

Insgesamt 11mal wurden diese Ergebnisse durch jeweils neue Einzelversuche reproduziert. Der zeitliche Rahmen der Aktivierung von ERK1 und ERK2 liegt danach zwischen 2 und 10 Minuten nach applizierter Dehnung, mit einem Maximum nach ca. 5 Minuten. Anschließend kommt es innerhalb 15 Minuten zu einer Deaktivierung mit einer Signalintensität, die der, der ungedehnten Negativkontrolle vergleichbar ist.

Diese Werte zeigen deutliche Parallelen zu den Ergebnissen weiterer Arbeitsgruppen, die an der Mechanotransduktion anderer Zellarten forschen. So bewies Sadoshima 1997 eine Aktivierung der ERK1/2 in mechanisch belasteten Herzmyozyten nach 5 Minuten (Sadoshima and Izumo, 1997). 1995 gelang Yamazaki der Nachweis einer ERK-Aktivierung, ebenfalls in Herzmyozyten, innerhalb eines Zeitraumes von 2-60 Minuten nach einer physiologischen Dehnung mit 0,2strain mit einem

Maximum nach 8 Minuten (Yamazaki et al., 1995). Takahashi belastete bovine Endothelzellen mittels „fluid shear stress“ in einer parallelwandigen Zellkammer. Die maximale ERK-Aktivierung zeigte sich hierbei nach ca. 10 Minuten (Takahashi et al., 1997). Eine Aktivierung der Osteosarkomzellen MG-63 mit IGF-1 führte zu einer maximalen Stimulierung von ERKs nach 5 Minuten (Zhang et al., 1999). Chaudhary et al. wiesen eine Aktivierung von ERK1 und ERK2 in humanen Osteoblasten (HOB), in MG-63-, SaOS-2-, ROS- und UMR-, sowie in MC3T3-E1-Zellen durch unterschiedliche Mitogene (bFGF, IGF-1, PDGF) innerhalb von 10 Minuten nach (Chaudhary and Avioli, 1998). Wadhwa zeigte eine „fluid shear stress“-induzierte ERK-Aktivierung in MC3T3-E1-Zellen mit einem Peak nach 5 Minuten und einer Signalreduktion zu Ausgangswerten nach ca. 30 Minuten (Wadhwa et al., 2002).

Mit obigen Ergebnissen gilt es als erwiesen, dass es nach physiologischer Dehnung der POB's zu einer zeitlich verzögerten Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 kommt, ebenso wie in anderen mechanosensiblen Zellreihen. Jedoch unterscheiden sich die Verhältnisse des Aktivierungsgrades von ERK1 zu ERK2 in Abhängigkeit von der untersuchten Spezies.

In den, für diese Arbeit durchgeführten Experimenten an POB's, kam es stets zu einem stärkeren ERK2 Signal im Vergleich zu ERK1. Eine mögliche Erklärung lieferte Chaudhary, der nachweisen konnte, dass es bei unterschiedlichen Spezies zu Differenzen in der Aktivierung der MAPKinasen in Osteoblasten kommt. So resultiert aus einer Stimulierung mit Wachstumsfaktoren in HOB- und HBSM-Zellen eine dominierende ERK2 Aktivierung (bovine Zellen besitzen mit ca. 95% eine große Homogenität zum humanen Genom), in Ratten-Osteoblasten eine homogene Aktivierung von ERK1 und ERK2 und in ROS-Zellen vornehmlich eine Aktivierung von ERK1. Möglicherweise ist aber auch die Stabilität von ERK1 geringer als die von ERK2 und zeigt daher eine geringere Aktivität im Immunoblot, oder die freigesetzte Menge an ERK1 könnte geringer sein. Die physiologische Signifikanz der Unterschiede ist allerdings bisher noch ungeklärt (Chaudhary and Avioli, 1997; Chaudhary

and Avioli, 1998). Vor wenigen Monaten postulierte Jessop nach physiologischer mechanischer Belastung von ROS-Zellen mit 600 Zyklen bei 3400 μ strain und 1Hz auf einer „four-point-bending-Maschine“ und nach Applikation von FSS „fluid shear stress“ unterschiedliche Aktivierungswege von ERK1 und ERK2. Er vermutet, dass die dehnungs-induzierte, schnelle ERK1-Aktivierung neben der Produktion von NO und Prostacyclin abhängig von intrazellulärer Calciummobilisierung ist, während die mechanische ERK2-Aktivierung vermutlich durch davon unabhängige Mechanismen erzielt wird (Jessop et al., 2002). Es zeigt sich also, dass zwischen den verschiedenen Spezies Unterschiede im Aktivierungsmuster der ERK's bestehen, ebenso liegt die Vermutung nahe, dass innerhalb einer Spezies die Aktivierung von ERK1 und ERK2 möglicherweise auf unterschiedlichen Wegen erfolgt.

Basierend auf Lanyons Tierexperimenten, in welchen er eine minimale Belastungszyklusanzahl von 30 Zyklen pro Belastung zum Erhalt der Knochensubstanz postulierte, wurden für die durchgeführten in vitro Experimente dieser Arbeit zum Nachweis der MAPKinasen-Aktivierung ebenfalls 30 Zyklen mit 1Hz appliziert (Lanyon et al., 1982). 1991 gelang es Jones, durch Messungen der Collagenaseaktivität belasteter Osteoblasten nachzuweisen, dass eine einmalige Belastung eine ebensolche Zellreaktion wie 30 Zyklen hervorruft (Jones et al., 1991). Es lag nun nahe, die ERK-Aktivierung in Abhängigkeit von der applizierten Zyklusanzahl zu untersuchen. Durch dieses Experiment konnten die Beobachtungen von Jones bestätigt werden. Bereits eine einmalige Dehnungsbelastung mit 4000 μ strain/1Hz ist ausreichend, um eine Aktivierung von ERK1/2 zu verursachen. Die weiteren Experimente unserer Arbeitsgruppe wurden jedoch weiterhin mit 30 Zyklen aus Gründen der Vergleichbarkeit der Versuchsbedingungen und aufgrund des im MTT-Test nachgewiesenen maximalen Proliferationszuwachs bei 30 Zyklen konstant gehalten.

Die zeitliche Latenz der Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 gibt Hinweise darauf, dass es sich hierbei nicht um die Erstreaktion der Zelle auf mechanische Belastung handelt, sondern vielmehr um einen „downstream“ befindlichen Abschnitt einer oder mehrerer vorgeschalteter Signalkaskaden. Yamazaki untersuchte in Herzmyozyten die Aktivierungszeiten der einzelnen Komponenten der MAPKinase-Kaskade nach einem mechanischen Stimulus. Er zeigte, dass es bereits nach 2 Minuten zu einer Aktivierung der MAPKKKinase (Raf), gefolgt von einer Aktivierung der MAPKKinase (MEK) nach ca. 5 Minuten, nach weiteren 3 Minuten zu einer Aktivierung der MAPKinasen ERK1 und ERK2 und schließlich nach ca. 10 Minuten zu einer Aktivierung der p90rsk kommt (Yamazaki et al., 1995). Eine Aktivierung der Ras-Kinase in Herzmyozyten innerhalb von ca. 1 Minute nach mechanischer Belastung konnte von Sadoshima gezeigt werden (Sadoshima and Izumo, 1993). Aber auch bei der Aktivierung von Ras, nach ca. 1 Minute, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei nicht um die Primärreaktion der Zelle handelt.

Ausgehend von unserem Ergebnis, welches eine ERK-Aktivierung nach mechanischer Belastung in POB's belegte, führten wir Inhibitor-Experimente durch, um durch gezielte Blockade „upstream“ liegender Komponenten dieses Ergebnis einer oder mehreren möglichen Signalkaskaden zuordnen zu können. Zunächst erfolgte die Blockierung der MAPKKinase (MEK) mit dem MEK-Inhibitor PD98059. Hierbei konnte gezeigt werden, dass durch Inhibierung des vorgeschalteten Signalmoleküls eine Aktivierung der ERKs in POB's nach mechanischer Belastung ausbleibt (s.4.5.2). Dieses Ergebnis ist kongruent zu anderen Arbeitsgruppen. Kawane und Zhang wiesen ein Ausbleiben der MAPKinasen-Aktivierung in UMR-106 bzw. in MG63 Zellen durch PD98059 nach Stimulation mit IGF-1 nach (Kawane and Horiuchi, 1999; Zhang et al., 1999). Kletsas unterzog humane periodontal ligament (hPDL) Osteoblasten kontinuierlicher mechanischer Belastung. Er fand einen deutlichen Anstieg der „early gene products“ c-fos und c-Jun. Dieser Effekt blieb allerdings nach Vorinkubation der Zellen mit dem Inhibitor

PD98059 aus (Kletsas et al., 2002). Hung wies ebenfalls ein Ausbleiben einer ERK-Aktivierung nach Inhibierung mit PD98059 in mechanisch belasteten Chondrozyten nach (Hung et al., 2000). Oldenhof wies eine Aktivierung von ERK1 und ERK2 nach Dehnung von Myometriumzellen nach. Nach MEK-Inhibierung mit PD98059 blieb diese nach Belastung aus (Oldenhof et al., 2002). Auch Wadhwa und Bao wiesen ein Ausbleiben der ERK-Aktivierung in POBs bzw. Endothelzellen nach Belastung und MEK-Inhibierung mit PD98059 nach (Wadhwa et al., 2002) (Bao et al., 2000). Es kann also als gesichert gelten, dass mechanische Belastung eine Aktivierung der ERK1 und ERK2 in mechanosensiblen Zellen verursacht und dass diese durch die vorgeschaltete MAPKinase-Kinase (MEK) an die ERK1/2 transduziert wird.

Nachdem Jones eine Aktivierung der PLC in weniger als einer Sekunde in mechanisch stimulierten Osteoblasten nachweisen konnte (Jones D.B. and Scholuebbbers J.G., 1987) (Jones D.B. and Scholuebbbers J.G., 1989), wurde von unserer Arbeitsgruppe ein weiterer Inhibitorversuch durchgeführt. Durch Inhibierung der, durch PLC aktivierten, Proteinkinase C (via DAG) durch NGIC-1 (Non-Glycosidic indolocarbazole 1) sollte eine mögliche Verbindung zur nachgewiesenen ERK – Aktivierung bewiesen werden. Da diese, nach Inhibierung der PKC und anschließender Belastung, ausblieb, konnte damit der Nachweis erbracht werden, dass die ERK1/2-Phosphorylierung in mechanisch stimulierten Osteoblasten über einen „upstream“ liegenden Prozeß einer aktivierten Proteinkinase C verläuft (Bromme and Jones D.B., 2000).

Ikeda unterzog bovine aortale Endothelzellen einer zyklischen Belastung mit 0,1strain und konstatierte ebenfalls eine Aktivierung der ERK's 1/2. Nach Behandlung der Zellen mit PD98059 blieb diese aus, interessanterweise hatte dies allerdings keinen Einfluß auf die gesteigerte Proliferation der Zellen (Ikeda et al., 1999). Demgegenüber konnte Zhang durch Blockade von MEK durch PD98059 nach Stimulation mit IGF-1 eine Inhibierung der Zellproliferation nachweisen (Zhang et al., 1999). In

folgenden Experimenten zeigte Ikeda weiter, dass die mechanische ERK-Aktivierung unter Beteiligung der PKC abläuft, indem er die Zellen mit dem PKC-Inhibitor Calphostin C behandelte. Des weiteren gelang ihm mittels des Ca^{2+} -Kanalblockers Gadolinium der Nachweis, dass die ERK-Aktivierung unabhängig von der intra- und extrazellulären Calciumkonzentration ist (Ikeda et al., 1999; Traub et al., 1997). Durch Anwendung des SERCA-Inhibitors Thapsigargin, der die Ca^{2+} -ATPase im endoplasmatischen Retikulum hemmt, konnte auch in POB's die Unabhängigkeit der ERK-Aktivierung von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nachgewiesen werden (Bromme and Jones D.B., 2000). Da aber Jones und andere Arbeitsgruppen ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Zellen nach mechanischer Belastung und konsekutiver PLC-Aktivierung nachweisen konnten, stellt sich nun die Frage nach der biochemischen Funktion des Ca^{2+} -Anstieges, da dieser aufgrund obiger Nachweise nicht direkt in die Aktivierung des ERK's involviert ist (Jones et al., 1995). D'Andrea stellte hierzu eine Hypothese auf, derzufolge der in Chondrozyten, durch mechanische Belastung, ausgelöste Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration als second messenger benachbarte Zellen über gap-junctions aktiviert, um eine einheitliche Gewebeantwort auf den gesetzten Stimulus zu erreichen. Experimentell konnte er diese Hypothese untermauern, indem er durch den PLC-Inhibitor U73123 und durch Thapsigargin eine Fortleitung der sog. „Calciumwelle“ an benachbarte Zellen unterbinden konnte (D'Andrea et al., 2000). Konträr dazu wies Mikuni-Takagaki in mechanosensiblen Osteocyten nach, dass der Calcium-Einstrom notwendig für die Triggerung der anabolen Reaktion der Osteocyten auf Stress ist (Mikuni-Takagaki, 1999). Auch Jessop und You sehen eine Verbindung von intrazellulärem Calciumanstieg und Aktivierung der MAPKinasen ERK1 und ERK2 in mechanisch belasteten ROS- bzw. MC3T3-E1- Zellen (Jessop et al., 2002) (You et al., 2001).

Aufgrund unserer Ergebnisse liegt allerdings die Vermutung nahe, dass es sich bei der, für die Aktivierung der MAPKinasen verantwortlichen PKC, um eine Ca^{2+} -unabhängige PKC-Isoform handelt. Hierbei handelt es sich

nach Traub, der vergleichbare Beobachtungen in Endothelzellen machte, möglicherweise um eine novell-PKC (delta, epsilon, eta, theta). Durch die Inhibierung der Isoform PKC-epsilon blieb die ERK-Aktivierung nach mechanischer Belastung aus, womit diese verantwortlich für die ERK-Aktivierung zu sein scheint (Traub et al., 1997). Auch Berk vermutet die Involvierung einer calciumunabhängigen PKC in die Aktivierung der MAPKinasen ERK 1/2 nach Applikation von „fluid shear stress“ auf Endothelzellen (Berk et al., 1995).

Shyy vermutet eine Aktivierung dieser PKC durch eine Verbindung mit den transmembranösen Integrinen, die den mechanischen Stimulus über ein intaktes Cytoskelett an nachgeschaltete Kinasen weiterzuleiten vermögen. Durch Interaktionen zwischen der extrazellulären Matrix und den Integrinen kommt es nach mechanischer Belastung zu Veränderungen der zytoskelettalen Proteine, wie α -Actinin, Vinculin, Talin, Tensin und Paxillin, wie auch zur Aktivierung der focal adhesion kinase (FAK) und der Src-Protein-Tyrosin-Kinase-Familie. Durch „Clustering“ (Quervernetzung und Zusammenlagerung der Integrinrezeptoren) kommt es zu einer örtlichen Konzentrierung von FAK und Src. Nach Autophosphorylierung von FAK lagert sich Src an dieses an, woraufhin sich im Anschluß daran das „Docking-Protein“ Grb2 anlagert, um unter Einbeziehung von SOS die Ras-Kinase zu aktivieren, welche dann schließlich ERK 1/2 über die bekannte Kinase-Kaskade aktiviert (Shyy and Chien, 1997). Lai wies in humanen Osteoblasten nach, dass aktivierte ERKs nicht nur, wie bereits bekannt für Zellwachstum und –differenzierung, sondern zusätzlich auch für Zelladhäsion, Migration und für die Expression von Integrinen eine entscheidende Rolle spielen (Lai et al., 2001). Auch Xiao und Suzawa beschreiben eine Aktivierung von MAPKinasen durch eine Verbindung mit den Integrinen und der extrazellulären Matrix, wodurch Signale zum Zellkern transduziert werden können (Xiao et al., 2002) (Suzawa et al., 2002). Li belegte erstmals in mechanosensiblen bovinen Endothelzellen eine Phosphorylierung von ERK durch mechanische Belastung in Form von FSS über eine aktivierte FAK (Li et al., 1997). Daher ist es durchaus denkbar, dass Cytoskelett-Integrin-Interaktionen ebenso auch die ERK-

Aktivierung in mechanisch belasteten Osteoblasten beeinflussen oder verursachen können. Clark beschreibt in diesem Zusammenhang eine mögliche Aktivierung der PKC über eine aktivierte FAK (Clark and Brugge, 1995). Somit wäre die mechanische Aktivierung einer calciumunabhängigen Proteinkinase C unter dem Einfluß der Integrine und des Cytoskeletts erklärbar. Dieses ist mit den Ergebnissen von Jones und Watson vereinbar, die beide nachwiesen, dass ein intaktes Zytoskelett essentiell für die Mechanotransduktion ist (s. 2.4.3) (Jones et al., 1991) (Watson et al., 1995).

Insgesamt muß man sich wohl von dem Gedanken lösen, dass nur eine Signaltransduktionskaskade ursächlich für die beobachteten Effekte einer physiologischen, mechanischen Belastung von mechanosensiblen Zellen ist. Vielmehr handelt es sich wahrscheinlich um ein Zusammenwirken mehrerer Signalkaskaden, die möglicherweise synergistisch, permissiv oder gar antagonistisch wirken können. Eine sehr interessante Hypothese hierzu stellt Berk auf. Er vermutet die Beteiligung einer calciumabhängigen und einer calciumunabhängigen Proteinkinasekaskade an der Mechanotransduktion in Endothelzellen. Der Ca^{2+} -abhängige Weg beinhaltet demnach die Aktivierung von Phospholipase C, Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat, Anstieg des intrazellulären Calciums und die Stimulierung von Kinasen, wie z.B. der Proteinkinase C. Der Ca^{2+} -unabhängige Weg beinhaltet demgegenüber die Aktivierung von GTP-bindendem Protein und Stimulierung einer Calcium-unabhängigen PKC, sowie die Aktivierung der MAPKinasen. Er postuliert, dass ersterer ein, auf Belastung schnell und kurzfristig reagierender Weg mit Synthese von NO und Anstieg der intrazellulären Ionenkonzentrationen ist (Ionenkanäle, PLC-Aktivierung), während der Calcium-unabhängige Weg im Gegensatz dazu eine langsamere und länger andauernde Reaktion der Zelle in Form von Änderung der Zellmorphologie und der Genexpression verursacht (via Integrine, FAK, ERK-Kaskade, etc.) (Berk et al., 1995).

Dieses Modell bietet gute Erklärungsansätze für die in unserer Arbeitsgruppe gefundenen Ergebnisse. So wäre die, mit ca. 5 Minuten

verzögerte, ERK1- und ERK- 2 Aktivierung durch eine aktivierte, calcium-unabhängige Proteinkinase C in POB's der calcium-unabhängigen Kaskade zuzuordnen, die von Jones nachgewiesene, innerhalb weniger als einer Sekunde stattfindende, PLC-Aktivierung und Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration der calcium-abhängigen Kaskade.

Die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse der, an verschiedenen Zelltypen forschenden Arbeitsgruppen, sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass an der Mechanotransduktion in unterschiedlichen Zellen unterschiedliche Transduktionsmechanismen partizipieren, da die Natur des mechanischen Stimulus, dem die Zellen physiologischerweise unterworfen sind, beachtlich differiert. Möglicherweise sind die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen innerhalb einer Zellspezies bezüglich der Mechanotransduktionsmechanismen auch aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen, insbesondere der applizierten Belastungsart und des Belastungsausmaßes widersprüchlich. Es ist durchaus denkbar, dass mechanosensible Osteoblasten auf unterschiedliche Belastungsarten und Belastungsausmaße unterschiedlich reagieren. Wünschenswert wäre es in diesem Zusammenhang, wenn sich die Forschungsgruppen auf einheitliche Versuchsbedingungen einigen würden, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. So wurden beispielsweise humane Osteoblasten von Matsuda einer zyklischen Belastung von $90.000\mu\text{strain}$ ausgesetzt (Dehnung der Zellen = 9%) (Matsuda et al., 1998). Dieser Wert liegt sicherlich im hyperphysiologischen Bereich, womit die Ergebnisse eines solchen Experimentes mit Vorbehalt zu verwerten sind. Des weiteren werden Osteoblasten einerseits biaxial, von anderen Arbeitsgruppen allerdings uniaxial belastet. Die physiologische Belastung der Osteoblasten ist eine uniaxiale. Biaxiale Dehnung führt zu einer additiven Belastung der elastischen Komponenten des Zytoskeletts. So entspricht eine biaxiale Belastung mit beispielsweise $300\mu\text{strain}$ einer uniaxialen Belastung mit $600\mu\text{strain}$ auf das Zytoskelett. Die biologischen Effekte sind dadurch eventuell entsprechend größer, da hierdurch möglicherweise auch mehr Mechanosensoren aktiviert werden (Jones et al., 1993).

Da im Labor für experimentelle Orthopädie und Biomechanik die Versuchsaufbauten und Versuchsabläufe, insbesondere die Kultivierung primärer boviner Osteoblasten, die 4-point-bending-Maschine, Inhibitor-Experimente und Immunoblotverfahren, standardisiert und optimiert wurden, sollten weitere Experimente folgen, die die bisher gewonnenen interessanten Erkenntnisse auf dem Gebiet der Mechanotransduktion in primären bovinen Osteoblasten ergänzen und vervollständigen:

Ergebnisse, die eine direkte Beteiligung von Ras und/oder Raf an der Aktivierung von ERK 1/2 in POB's nach mechanischer Belastung in POB's zeigen, liegen derzeit noch nicht vor. Durch eine Inhibierung des Ras-Proteins mit einem Farnesyltransferase-Inhibitor, oder durch Inhibierung des Raf-Proteins mit anschließender mechanischer Belastung könnte man dies nach dem selben Muster wie die MEK-Inhibition untersuchen. In einem weiteren Experiment könnte der interessante Aspekt, dass es in bovinen aortalen Endothelzellen trotz Inhibierung von MEK und damit fehlender ERK-Aktivierung zu einer Zunahme der Proliferation der Endothelzellen kommt, auch an POB's untersucht werden, indem beispielsweise das MTT-Proliferationsassay nach Inkubation der Zellen mit dem MEK-Inhibitor PD98059 durchgeführt wird. Des weiteren sollte in naher Zukunft eine Beteiligung der PKC-epsilon und der FAK an der Mechanotransduktion in POB's durch Inhibitor- oder Antikörper-Experimente untersucht werden. Auch der Nachweis, dass möglicherweise die PKC-epsilon via ECM, Integrine und FAK aktiviert wird und dann den Stimulus auf die MAPKinase-Kaskade weiterleitet, könnte so geführt werden.

Antworten auf diese Fragen würden ein besseres Verständnis in dem großen und noch mit vielen Fragezeichen versehenen Gebiet der Mechanotransduktion in Osteoblasten bringen und gegebenenfalls der Entwicklung von Strategien zur Prävention und Behandlung von Knochenerkrankungen, wie z.B. Osteoporose, „space-osteoporosis“ oder Frakturen dienen.

Es ist bekannt, dass es unter Schwerelosigkeit zu einer Verminderung der Knochenmasse bzw. der Knochendichte (Osteopenie/Osteoporose) kommt. Körperliche Belastung führt dagegen zum Erhalt oder sogar zur Steigerung der Knochenmasse. Verursacht wird dies durch Gewebeadaptation, in welche Änderung der Osteoblastenproliferation und – differenzierung involviert sind. Die Abwesenheit mechanischer Belastungen unter Schwerelosigkeit mag die beobachteten Zellreaktionen erklären. Hinweise darauf liefert Wronski, der nachweisen konnte, dass es in den Knochen, die normalerweise den größten Belastungen ausgesetzt sind (Tibiae der Versuchsratten), zu den größten Knochenverlusten unter Schwerelosigkeit kommt (Wronski and Morey, 1983). Die zugrunde liegenden Mechanismen der Signaltransduktion sind aber auch auf diesem Gebiet noch weitgehend unbekannt.

Nachdem mit den Ergebnissen dieser Arbeit die Aktivierung der MAPKinasen ERK1 und ERK2 durch mechanische Belastung nachgewiesen war, sollte nun in Zusammenarbeit mit dem DLR und der ESA der Einfluß von Schwerelosigkeit auf die Mechanotransduktion in Osteoblasten unter besonderer Beachtung der ERK 1/2 untersucht werden. Die Ergebnisse (s.4.6.2) zeigen, dass Schwerelosigkeit Einfluß auf die Aktivierung der ERKs hat. Es kommt zu einer Verschiebung des Aktivierungsverhältnisses zwischen ERK1 und ERK2 zugunsten von ERK1. In allen 4 Immunoblots dominiert nach der 1. Parabel die ERK1-Aktivierung. In der 1g-Kontrolle ist weiterhin $ERK2 > ERK1$. Nach 15 Parabeln liegt eine weitgehend homogene Aktivierung vor. Interessanterweise ist sowohl bei den 0g-Zellen, wie auch bei den 1g-Kontrollen nach der 30. Parabel kein ERK-Signal zu detektieren. Nach weiteren 7 Minuten sind wieder Signale vorhanden, diesmal allerdings bei den 1g-Zellen ein verstärktes ERK1- und bei den 0g-Zellen ein stärkeres ERK2-Signal.

Da diese Versuche aufgrund der Versuchsbedingungen ausgesprochen aufwendig und teuer sind, stehen derzeit leider noch keine vergleichbaren Ergebnisse zur Verfügung, um ggf. den Verdacht auf Flugartefakte (Vibrationen, 1,8g-Phase vor 0g-Phase) zu widerlegen.

Neuere Daten zeigen, dass der mRNA-Level für verschiedene knochenspezifische Proteine in Rattenknochen durch Schwerelosigkeit beeinträchtigt wird. Ein diesem zugrunde liegender Mechanismus ist möglicherweise die von den Osteoblasten selbst wahrgenommene Veränderung des Gravitationsumfeldes. Dieses äußert sich in Veränderung der Zell- und Kernmorphologie ebenso, wie in veränderter Expression von Wachstumsfaktoren, wie IL-6 und IGF, sowie in der Verringerung der Matrixproteine Kollagen Typ I und Osteocalcin (Carmeliet et al., 2001; Carmeliet and Bouillon, 1999). 1998 wies Carmeliet nach 9 Tagen Schwerelosigkeit eine verminderte Differenzierungsleistung von MG63-Osteosarkom-Zellen nach. Nach Stimulation dieser Zellen mit Dihydroxycholecalciferol (Vitamin D) und TGFbeta kam es im Vergleich zur Bodenkontrollgruppe zu einer verminderten Genexpression für Kollagen Typ I (51%) und für Osteocalcin (19%) (Carmeliet et al., 1998). Auf Grundlage dieser Ergebnisse führte Gebken einen Versuch unter Hypergravitation durch, indem er humane Osteoblasten mit 13xg belastete. Hierbei kam es zu einem 42% +/- 16%igen Anstieg des Kollagen Typ I und zu einem entsprechendem Anstieg der Kollagen Typ I – mRNA. Des weiteren zeigte er, dass die Aktivierung von ERK1/2 deutlich zugenommen hatte. Nach Inhibierung dieses Weges nahm die Kollagenproduktion um 50% ab, womit bewiesen war, dass die Kollagensynthese, zumindest teilweise, über den MAPKinase-Pathway abläuft (Gebken et al., 1999).

Im Umkehrschluß bedeutet dies, dass Schwerelosigkeit Einfluß auf den MAPKinase-Pathway hat und es u.a. so zu der oben beschriebenen verminderten Kollagenproduktion kommen könnte.

Dass ERK1/2 in die Mechanotransduktion der Schwerelosigkeit involviert ist, konnte auch Granet nachweisen. Durch simulierte Schwerelosigkeit (Clinostat) wies er eine Erg-1-Gen Induktion durch aktivierte ERK1/2 in ROS-Zellen nach (Granet et al., 2001).

Verschiedene Forscher vermuten als erste Reaktion der Zelle auf Schwerelosigkeit eine Beeinträchtigung des Cytoskelettes (Burger and

Klein-Nulend, 1998). Jones vermutet, dass es aufgrund der relativ hohen Dichte des Zytoskelettes besonders in diesen Bereichen unter Schwerelosigkeit zu Veränderungen mit konsekutiver Beeinflussung nachgeschalteter Signalkaskaden kommt (Jones D.B. et al., 1995). Guignandon beschreibt die Beeinträchtigung der Integrin-vermittelten Adhäsion von Osteoblasten durch Schwerelosigkeit auf Grundlage einer nachgewiesenen Desorganisation des Cytoskelettes (Guignandon et al., 2001). Somit könnte hierdurch, die noch hypothetische Aktivierung der MAPKinase-Kaskade durch Integrine über PKC-epsilon, Ras/Raf, MEK, ERKs durch Schwerelosigkeit modifiziert werden.

1998 wiesen Lewis et al. eine verstärkte Apoptose (programmierter Zelltod) in humanen T-Lymphozyten nach Schwerelosigkeit nach. Sie schlußfolgerten, dass die Beeinträchtigung des Cytoskeletts, das verminderte Zellwachstum und die metabolischen Veränderungen der Zelle mit der gesteigerten Apoptose einhergehen (Lewis et al., 1998). Ähnliche Hinweise fand Rucci, der in ROS-Zellen nach Schwerelosigkeit u.a. eine verstärkte Expression von alkalischer Phosphatase und IL-6 fand. Er vermutete die Aktivierung einer intrazellulären Kaskade durch Schwerelosigkeit, die den programmierten Zelltod einleitet. IL-6 sei seiner Meinung nach für die Aktivierung der Osteoclasten und damit für die erhöhte Knochenresorption verantwortlich (Rucci et al., 2002).

Insgesamt existieren zur Zeit auf dem Gebiet des Einflusses von Schwerelosigkeit auf die Osteoblasten noch viele Unklarheiten. Eine Beteiligung der ERK1 und ERK2, vermutlich über Aktivierung oder Deaktivierung vorgeschalteter Kinasen, die wiederum möglicherweise durch Integrin- oder Cytoskelettbeteiligung aktiviert/deaktiviert werden, wird derzeit favorisiert. In diesen Kontext passen auch die Ergebnisse dieser Arbeit. Zeigen sie doch ein deutlich anderes Signalmuster, als dies bei mechanischer Belastung nachzuweisen ist. Das unterschiedliche Signalverhalten von ERK 1 zu ERK 2 im Vergleich zu dem, aus mechanischer Belastung resultierenden, ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass es durch Schwerelosigkeit kurzfristig zu einer Inhibition der

ERK2- Aktivierung oder zu einer vermehrten ERK1 – Aktivierung kommt. Warum nach 30 Parabeln weder in der 1g-Kontrolle, noch bei den 0g-Zellen eine ERK-Aktivierung nachzuweisen ist, kann derzeit noch nicht beurteilt werden.

Es werden noch eine Vielzahl weiterer Experimente notwendig sein, um Antworten auf die Fragen der Mechanotransduktion in Schwerelosigkeit zu finden.

6. Zusammenfassung

Knochen ist adaptives Gewebe! Je nach Belastung wird Knochen auf-, ab- und umgebaut. Dies ist schon lange bekannt. Allerdings ist bis heute ungeklärt, welche mechanischen Komponenten für den Knochenumbauprozess und welche intrazellulären Signaltransduktionswege letztendlich dafür verantwortlich sind. Während normaler Fortbewegungen werden Belastungen in Höhe von 2000 – 4000 μ strain auf den Knochen ausgeübt, wodurch sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten zum „Bone remodeling“ stimuliert werden. Durch Immobilisation oder Schwerelosigkeit verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau, wodurch es zu einem raschen Verlust an Knochensubstanz kommt.

Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung der Mechanotransduktion in primären bovinen Osteoblasten, insbesondere der Einfluß von mechanischer Belastung auf die „extracellular regulated Kinases“ ERK1 und ERK2 als Bestandteil der MAPKinase-Kaskade und der Einfluß von Schwerelosigkeit auf den Aktivierungsgrad dieser MAPKinasen. Ziel war es, neue Hinweise auf die beteiligten Signalkaskaden zu erlangen, um damit langfristig einen Beitrag zu neuen Präventions- und Therapiekonzepten bei verschiedenen Knochenerkrankungen zu leisten.

Mit dieser Arbeit konnte erstmals dargelegt werden, dass die MAPKinasen ERK1 und ERK2 an der Mechanotransduktion in primären bovinen Osteoblasten beteiligt sind. Es kommt innerhalb eines Zeitraumes von 2-10 Minuten nach Dehnung mit der 4-Punkt-Dehnungsmaschine zu einer Phosphorylierung von ERK1 und ERK2, mit einem Maximum nach 5 Minuten. Bereits eine einmalige physiologische Belastung mit 4000 μ strain ist ausreichend, um die untersuchten Kinasen zu aktivieren. Durch Inhibition vorgeschalteter Kinasen konnte nachgewiesen werden, dass ERK1 und ERK2 durch Bestandteile der bekannten MAPKinase-Kaskade aktiviert werden, nämlich durch MEK.

Eine Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die Bedingungen unter Schwerelosigkeit sollte durch Parabelflug-Experimente untersucht werden. Auch hierbei konnte eine Beteiligung der MAPKinasen ERK1 und ERK2 nachgewiesen werden. Zwischen Positiv- und Negativkontrollen dieser Experimente sind eindeutige Unterschiede im Aktivierungsmuster von ERK1 und ERK2 zu erkennen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Schwerelosigkeit und die damit verbundenen physiologischen Veränderungen des Knochens und seiner Zellen auch über die MAPKinasen ERK1 und ERK2 beeinflusst werden.

Sicherlich sind zukünftig noch eine Vielzahl weiterer Experimente notwendig, um den Prozeß der Mechanotransduktion in Osteoblasten gänzlich zu ergründen.

7. Literaturverzeichnis

1. Aarden,EM, A M Wassenaar, M J Alblas, P J Nijweide, 1996, Immunocytochemical demonstration of extracellular-matrix proteins in isolated osteocytes: Histochemistry And Cell Biology, v. 106, p. 495-501.
2. Abendroth,K, 1992, Der Osteoblast: Funktion und hormonelle Regulation, in TH Ittel (ed), Aktuelle Aspekte der Osteologie: Heidelberg, Springer-Verlag, p. 3-9.
3. Al-Ajmi,N, I P Braidman, D Moore, 1993, Effect of clinostat rotation on differentiation of embryonic bone *in vitro*: Proc.5th Eur.Symp.on 'Life Sciences Research in Space' Arcachon, France, v. 1, p. 73-76.
4. Aubin,JE, E Bonnelye, 2000, Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption: Osteoporos.Int., v. 11, p. 905-913.
5. Bao,X, C B Clark, J A Frangos, 2000, Temporal gradient in shear-induced signaling pathway: involvement of MAP kinase, c-fos, and connexin43: Am.J Physiol Heart Circ.Physiol, v. 278, p. H1598-H1605.
6. BASSETT C.A.L., Pawluk R.J., Becker R.O., 1964, Effects of Electric currents on Bone in vivo: Nature, v. 204, p. 652-654.
7. Berk,BC, M A Corson, T E Peterson, H Tseng, 1995, Protein kinases as mediators of fluid shear stress stimulated signal transduction in endothelial cells: a hypothesis for calcium-dependent and calcium-independent events activated by flow: J Biomech., v. 28, p. 1439-1450.
8. Bikle,DD, J Harris, B P Halloran, E Moreyholton, 1994, Altered skeletal pattern of gene-expression in response to spaceflight and hindlimb elevation: American Journal Of Physiology-Endocrinology And Metabolism, v. 30, p. E 822-E 827.
9. Boguski,MS, F McCormick, 1993, Proteins regulating Ras and its relatives: Nature, v. 366, p. 643-654.
10. BRADFORD M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding: Analytical.Biochem., v. 72, p. 248-254.
11. Bromme,B, Jones D.B. Charakterisierung der mechanosensitiven Signaltransduktion in Osteoblasten anhand der MAP-Kinase. 2000. Labor für experimentelle Orthopädie und Biomechanik.
Ref Type: Thesis/Dissertation
12. Buddecke,E, 1981, Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin, de Gruyter Verlag.
13. Burger,EH, J Klein-Nulend, 1998, Microgravity and bone cell mechanosensitivity: Bone, v. 22, p. 127S-130S.
14. Burgering,BM, J L Bos, 1995, Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat: Trends Biochem.Sci., v. 20, p. 18-22.
15. Burkhardt,R, 1992, Der Osteoblast - Schlüssel zum Verständnis des Skelettorgans: Osteologie, v. 1, p. 139-151.
16. Carmeliet,G, R Bouillon, 1999, The effect of microgravity on morphology and gene expression of osteoblasts in vitro: FASEB J, v. 13 Suppl, p. S129-S134.

17. Carmeliet,G, G Nys, I Stockmans, R Bouillon, 1998, Gene Expression related to the differentiation of osteoblastic cells is altered by microgravity: *Bone*, v. 22, p. 139S-143S.
18. Carmeliet,G, L Vico, R Bouillon, 2001, Space flight: a challenge for normal bone homeostasis: *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.*, v. 11, p. 131-144.
19. Cary,LA, D C Han, J L Guan, 1999, Integrin-mediated signal transduction pathways: *Histol.Histopathol.*, v. 14, p. 1001-1009.
20. Chaudhary,LR, L V Avioli, 1997, Activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1 and ERK2) by FGF-2 and PDGF-BB in normal human osteoblastic and bone marrow stromal cells: differences in mobility and in-gel renaturation of ERK1 in human, rat, and mouse osteoblastic cells: *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 238, p. 134-139.
21. Chaudhary,LR, L V Avioli, 1998, Identification and activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in normal human osteoblastic and bone marrow stromal cells: attenuation of MAP kinase activation by cAMP, parathyroid hormone and forskolin: *Mol.Cell Biochem.*, v. 178, p. 59-68.
22. Clark,EA, J S Brugge, 1995, Integrins and signal-transduction pathways - the road taken: *Science*, v. 268, p. 233-239.
23. Corral,DA, M Amling, M Priemel, E Loyer, S Fuchs, P Ducy, R Baron, G Karsenty, 1998, Dissociation between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 95, p. 13835-13840.
24. Cowin,SC, 1998, On mechanosensation in bone under microgravity: *Bone*, v. 22, p. 119S-125S.
25. D'Andrea,P, A Calabrese, I Capozzi, M Grandolfo, R Tonon, F Vittur, 2000, Intercellular Ca²⁺ waves in mechanically stimulated articular chondrocytes: *Biorheology*, v. 37, p. 75-83.
26. Darnell,JE, Jr., I M Kerr, G R Stark, 1994, Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins: *Science*, v. 264, p. 1415-1421.
27. David,M, E Petricoin, III, C Benjamin, R Pine, M J Weber, A C Lerner, 1995, Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon α : *Science*, v. 269, p. 1721-1723.
28. Davidson,RM, D W Tatakis, A L Auerbach, 1990, Multiple forms of mechanosensitive ion channels in osteoblast-like cells: *Pflugers Arch.*, v. 416, p. 646-651.
29. Dibbets,JMH, 1992, One century of Wolff's law, in ED Carlson (ed), *Current concepts in bone growth and remodeling dynamics*: Ann Harbor, University of Michigan, Center for Human Growth and Development, p. 1-13.
30. Duncan,R, S Misler, 1989, Voltage-activated and stretch-activated Ba²⁺ conducting channels in an osteoblast-like cell line (UMR 106): *FEBS Lett.*, v. 251, p. 17-21.
31. Duncan,RL, K A Akanbi, M C Farach-Carson, 1998, Calcium signals and calcium channels in osteoblastic cells: *Semin.Nephrol.*, v. 18, p. 178-190.
32. Essen,LO, O Perisic, R Cheung, M Katan, R L Williams, 1996, Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta [see comments]: *Nature*, v. 380, p. 595-602.

33. Felsenberg,D, 2001, [Supporting function of collagen and hydroxyapatite. Structure and function of bone]: Pharm.Unserer Zeit, v. 30, p. 488-494.
34. Finbloom,DS, A C Lerner, 1995, Regulation of the Jak/STAT signalling pathway: Cell Signal., v. 7, p. 739-745.
35. Fu,Q, R L Jilka, S C Manolagas, C A O'Brien, 2002, Parathyroid hormone stimulates receptor activator of NFkappa B ligand and inhibits osteoprotegerin expression via protein kinase A activation of CREB: J Biol.Chem..
36. Gebken,J, B Luders, H Notbohm, H H Klein, J Brinckmann, P K Muller, B Batge, 1999, Hypergravity stimulates collagen synthesis in human osteoblast-like cells: evidence for the involvement of p44/42 MAP-kinases (ERK 1/2): J Biochem.(Tokyo), v. 126, p. 676-682.
37. Gonzalez,FA, D L Raden, R J Davis, 1991, Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases: J.Biol.Chem., v. 266, p. 22159-22163.
38. Granet,C, N Boutahar, L Vico, C Alexandre, M H Lafage-Proust, 2001, MAPK and SRC-kinases control EGR-1 and NF-kappa B inductions by changes in mechanical environment in osteoblasts: Biochem.Biophys.Res Commun., v. 284, p. 622-631.
39. Guharay,F, F Sachs, 1984, Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle: J.Physiol, v. 352, p. 685-701.
40. Guignandon,A, M H Lafage-Proust, Y Usson, N Laroche, A Caillot-Augusseau, C Alexandre, L Vico, 2001, Cell cycling determines integrin-mediated adhesion in osteoblastic ROS 17/2.8 cells exposed to space-related conditions: FASEB J, v. 15, p. 2036-2038.
41. Guignandon,A, L Vico, C Alexandre, M H Lafage-Proust, 1995, Shape changes of osteoblastic cells under gravitational variations during parabolic flight--relationship with PGE2 synthesis: Cell Struct.Funct., v. 20, p. 369-375.
42. Harris,AK, N K Pryer, D Paydarfar, 1990, Effects of electric fields on fibroblast contractility and cytoskeleton: J.Exp.Zool., v. 253, p. 163-176.
43. Herr,M, N Kamps, C Biener, 1999, Calcium metabolism in microgravity: Eur J Med Res, v. Sep 9, p. 357-360.
44. Hipkind,RA, G Bilbe, 1998, MAP Kinase Signaling Cascades and Gene Expression in Osteoblasts: Frontiers in Bioscience, v. 3, p. D804-D816.
45. Hofbauer,LC, A E Heufelder, 2001, Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology: J Mol.Med, v. 79, p. 243-253.
46. Hughes-Fulford,M, R Tjandrawinata, J Fitzgerald, K Gasuad, V Gilbertson, 1998, Effects of microgravity on osteoblast growth: Gravit.Space Biol.Bull., v. 11, p. 51-60.
47. Hung,CT, D R Henshaw, C C Wang, R L Mauck, F Raia, G Palmer, P H Chao, V C Mow, A Ratcliffe, W B Valhmu, 2000, Mitogen-activated protein kinase signaling in bovine articular chondrocytes in response to fluid flow does not require calcium mobilization: J.Biomech., v. 33, p. 73-80.
48. Ikeda,M, T Takei, I Mills, H Kito, B E Sumpio, 1999, Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 activation in endothelial cells exposed to cyclic strain: Am.J Physiol, v. 276, p. H614-H622.

49. Ingber,D, 1991, Integrins as mechanochemical transducers: *Curr.Opin.Cell Biol.*, v. 3, p. 841-848.
50. Jessop,HL, S C Rawlinson, A A Pitsillides, L E Lanyon, 2002, Mechanical strain and fluid movement both activate extracellular regulated kinase (ERK) in osteoblast-like cells but via different signaling pathways: *Bone*, v. 31, p. 186-194.
51. Jessop,HL, M Sjöberg, M Z Cheng, G Zaman, C P Wheeler-Jones, L E Lanyon, 2001, Mechanical strain and estrogen activate estrogen receptor alpha in bone cells: *J Bone Miner.Res.*, v. 16, p. 1045-1055.
52. Jones D.B., G Leivseth, A E Goodship, 1995, Osteoblast intracellular free calcium measurements in microgravity by ratio imaging and photometry: *J.Biomech.*, p. 363-379.
53. Jones D.B., Scholuebbbers J.G., 1987, Evidence that phospholipase C mediates the mechanical stress effect in bone: *Calcif.Tiss.Int.*, v. 41, p. supp p4.
54. Jones D.B., Scholuebbbers J.G., 1989, A role for PI-phospholipase C in the medium of mechanical stress in bone surface cells.: *Calcif.Tiss.Int.*, v. 44(supp), p. S-97;P6.
55. Jones,D, G Leivseth, J Tenbosch, 1995, Mechano-reception in osteoblast-like cells: *Biochemistry And Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire*, v. 73, p. 525-534.
56. Jones,DB, D Bingmann, 1991, How do osteoblasts respond to mechanical stimulation: *Cells And Materials*, v. 1, p. 329-340.
57. Jones,DB, G Leivseth, Y Sawada, J van der Sloten, D Bingmann, 1993, Application of homogenous, defined strains to cell cultures, in F Lyall and AJ el Haj (eds), *Society for Experimental Biology: Cambridge*, Cambridge University Press, p. 197-219.
58. Jones,DB, H Nolte, J-G Scholubbers, E Turner, D Veltel, 1991, Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells: *Biomaterials*, v. 12, p. 101-110.
59. Katagiri,T, N Takahashi, 2002, Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation: *Oral Dis.*, v. 8, p. 147-159.
60. Kawane,T, N Horiuchi, 1999, Insulin-like growth factor I suppresses parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor expression via a mitogen-activated protein kinase pathway in UMR-106 osteoblast-like cells: *Endocrinology*, v. 140, p. 871-879.
61. Kletsas,D, E K Basdra, A G Papavassiliou, 2002, Effect of protein kinase inhibitors on the stretch-elicited c-Fos and c-Jun up-regulation in human PDL osteoblast-like cells: *J Cell Physiol*, v. 190, p. 313-321.
62. Kostenuik,PJ, V Shalhoub, 2001, Osteoprotegerin: a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption: *Curr.Pharm.Des.*, v. 7, p. 613-635.
63. Krauss,G, 1997, *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*.
64. Kyhse-Andersen,J, 1984, Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: *J Biochem.Biophys.Methods*, v. 10, p. 203-209.

65. Kyriakis, JM, T L Force, U R Rapp, J V Bonventre, J Avruch, 1993, Mitogen regulation of c-Raf-1 protein kinase activity toward mitogen-activated protein kinase-kinase: *J.Biol.Chem.*, v. 268, p. 16009-16019.
66. Laemmli, UK, 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4: *Nature*, v. 227, p. 680-685.
67. Lai, CF, L Chaudhary, A Fausto, L R Halstead, D S Ory, L V Avioli, S L Cheng, 2001, Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells: *J Biol.Chem.*, v. 276, p. 14443-14450.
68. Landis, WJ, K J Hodgens, D Block, C D Toma, L C Gerstenfeld, 2000, Spaceflight effects on cultured embryonic chick bone cells: *J Bone Miner.Res.*, v. 15, p. 1099-1112.
69. Langlois, WJ, T Sasaoka, A R Saltiel, J M Olefsky, 1995, Negative feedback regulation and desensitization of ins: *J Biol.Chem.*, v. 270, p. 25320-25323.
70. Lanyon, LE, 1972, In vivo bone strain recorded from thoracic vertebrae of sheep: *J.Biomech.*, v. 5, p. 277-281.
71. Lanyon, LE, 1984, Functional strain as a determinant for bone remodelling: *Calcif.Tissue Int.*, v. 36, p. 556-561.
72. Lanyon, LE, A E Goodship, C J Pye, J H MacFie, 1982, Mechanically adaptive bone remodelling: *J Biomech.*, v. 15, p. 141-154.
73. Lanyon, LE, P T Mages, D G Baggott, 1979, The relationship of functional stress and strain to the processes of bone remodeling. An experimental study on the sheep radius.: *J.Biomech.*, v. 12, p. 593-600.
74. Lanyon, LE, C T Rubin, G Baust, 1986, Modulation of bone loss during calcium insufficiency by controlled dynamic loading: *Calcif.Tissue Int.*, v. 38, p. 209-216.
75. Lewis, ML, J L Reynolds, L A Cubano, J P Hatton, B D Lawless, E H Piepmeier, 1998, Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat): *FASEB J*, v. 12, p. 1007-1018.
76. Li, S, M Kim, Y L Hu, S Jalali, D D Schlaepfer, T Hunter, S Chien, J Y Shyy, 1997, Fluid shear stress activation of focal adhesion kinase. Linking to mitogen-activated protein kinases: *J Biol.Chem.*, v. 272, p. 30455-30462.
77. Lilienfeld, Hv, 1992, Wachstumsfaktoren und Knochenremodellierung, in TH Ittel, HG Siebert, and HH Matthiaß (eds), *Aktuelle Aspekte der Osteologie*: Heidelberg, Springer-Verlag Berlin, p. 18-23.
78. Mann, HB, D R Whitney, 1947, On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other: *Ann.Math.Statist.*, v. 18, p. 50-60.
79. Matsuda, N, N Morita, K Matsuda, M Watanabe, 1998, Proliferation and differentiation of human osteoblastic cells associated with differential activation of MAP kinases in response to epidermal growth factor, hypoxia, and mechanical stress in vitro: *Biochem.Biophys.Res Commun.*, v. 249, p. 350-354.
80. Mayer, H, A Scutt, E Wingender, 1992, Differenzierung von knochenbildenden Zellen: Systeme und Regulatoren: *Z.Orthop.*, v. 130, p. 276-284.
81. McKee, MD, A Nanci, 1995, Osteopontin and the bone remodeling sequence. Colloidal-gold immunocytochemistry of an interfacial extracellular matrix protein: *Ann N.Y.Acad.Sci.*, v. 760, p. 177-189.

82. Mikuni-Takagaki,Y, 1999, Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes: J Bone Miner.Metab, v. 17, p. 57-60.
83. Miyamoto,S, B Z Katz, R M Lafrenie, K M Yamada, 1998, Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis: Ann.N.Y.Acad.Sci., v. 857:119-29, p. 119-129.
84. Miyamoto,S, H Teramoto, O A Coso, J S Gutkind, P D Burbelo, S K Akiyama, K M Yamada, 1995, Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules: J.Cell Biol., v. 131, p. 791-805.
85. Mochlyrosen,D, 1995, Localization of protein-kinases by anchoring proteins - a theme in signal-transduction: Science, v. 268, p. 247-251.
86. Morrison,DK, G Heidecker, U R Rapp, T D Copeland, 1993, Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase: J.Biol.Chem., v. 268, p. 17309-17316.
87. Mosmann,T, 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays: J.Immunolog.Meth., v. 65, p. 55-63.
88. Oldenhof,AD, O P Shynlova, M Liu, B L Langille, S J Lye, 2002, Mitogen-activated protein kinases mediate stretch-induced c-fos mRNA expression in myometrial smooth muscle cells: Am.J Physiol Cell Physiol, v. 283, p. C1530-C1539.
89. Paul,A, S Wilson, C M Belham, C J Robinson, P H Scott, G W Gould, R Plevin, 1997, Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function: Cell Signal., v. 9, p. 403-410.
90. Poo,M, K R Robinson, 1977, Electrophoresis of concanavalin A receptors along embryonic muscle cell membrane: Nature, v. 265, p. 602-605.
91. Read,SM, D H Northcote, 1981, Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein: Anal.Biochem., v. 116, p. 53-64.
92. Reichel,H, 1992, Endokrine und parakrine Wirkungen von 1,25(OH)₂D₃, in TH Ittel, HG Siebert, and HH Matthiaß (eds), Aktuelle Aspekte der Osteologie: Heidelberg, Springer Verlag Berlin, p. 24-29.
93. Reiners,JJ, Jr., J Y Lee, R E Clift, D T Dudley, S P Myrand, 1998, PD98059 is an equipotent antagonist of the aryl hydrocarbon receptor and inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase: Mol.Pharmacol., v. 53, p. 438-445.
94. Rijken,PJ, R P de Groot, W Kruijer, J Boonstra, A J Verkleij, S W de Laat, 1989, Epidermal Growth Factor (EGF)-Induced Signal Transduction in A431 Cells is Sensitive to Gravity: Proceedings of a special ESA Symposium (Utrecht,1989), p. 21-28.
95. Rosa-Ranal,M, D A de la Cruz, Y Lorena-Rubio, F Larrea, 2001, [New paradigms in the regulation of bone metabolism]: Rev.Invest Clin., v. 53, p. 362-369.
96. Roux,W, 1881b, Der Kampf der Teile im Organismus: Biol.Centralbl., v. 1, p. 241-251.
97. Roux,W, 1881a, Der Kampf der Theile im Organismus: Engelmann, Leipzig.
98. Rucci,N, S Migliaccio, B M Zani, A Taranta, A Teti, 2002, Characterization of the osteoblast-like cell phenotype under microgravity conditions in the NASA-

- approved rotating wall vessel bioreactor (RWV): *J Cell Biochem.*, v. 85, p. 167-179.
99. Sadoshima, J, S Izumo, 1993, Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism: *EMBO J.*, v. 12, p. 1681-1692.
 100. Sadoshima, J, S Izumo, 1997, The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress: *Annu. Rev. Physiol.*, v. 59, p. 551-571.
 101. Sato, A, T Hamazaki, T Oomura, H Osada, M Kakeya, M Watanabe, T Nakamura, Y Nakamura, N Koshikawa, I Yoshizaki, S Aizawa, S Yoda, A Ogiso, M Takaoki, Y Kohno, H Tanaka, 1999, Effects of microgravity on c-fos gene expression in osteoblast-like MC3T3-E1 cells: *Adv. Space Res.*, v. 24, p. 807-813.
 102. Schoppet, M, K T Preissner, L C Hofbauer, 2002, RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 22, p. 549-553.
 103. Seger, R, N G Ahn, T G Boulton, G D Yancopoulos, N Panayotatos, E Radziejewska, L Ericsson, R L Bratlien, M H Cobb, E G Krebs, 1991, Microtubule-associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues: implications for their mechanism of activation: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 88, p. 6142-6146.
 104. Seger, R, E G Krebs, 1995, The MAPK signaling cascade: *FASEB J.*, v. 9, p. 726-735.
 105. Seko, Y, N Takahashi, K Tobe, T Kadowaki, Y Yazaki, 1999, Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase (p125(FAK)) in cultured rat cardiac myocytes: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 259, p. 8-14.
 106. Shyy, JY, S Chien, 1997, Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion: *Curr. Opin. Cell Biol.*, v. 9, p. 707-713.
 107. Simonet, WS, D L Lacey, C R Dunstan, M Kelley, M S Chang, R Luthy, H Q Nguyen, S Wooden, L Bennett, T Boone, G Shimamoto, M DeRose, R Elliott, A Colombero, H L Tan, G Trail, J Sullivan, E Davy, N Bucay, L Renshaw-Gegg, T M Hughes, D Hill, W Pattison, P Campbell, W J Boyle, ., 1997, Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density: *Cell*, v. 89, p. 309-319.
 108. Skerry, TM, R Suswillo, A J el Haj, N N Ali, R a Dodds, L E Lanyon, 1990, Load-induced proteoglycan orientation in bone tissue in vivo and in vitro: *Clacified Tissue International*, v. 46, p. 318-326.
 109. Smith, EL, D M Raab, 1986, Osteoporosis and physical activity: *Acta Med. Scand. Suppl.*, v. 711, p. 149-156.
 110. Sumpio B.E., Du W., Cohen C.R., Evans L., Isales C., Rosales O.R., Mills I., 1994, Signal transduction pathways in vascular cells exposed to cyclic strain, in F. Lyall and A.J. El Haj (eds), *Society for Experimental Biology Seminar Series 54: Biomechanics and Cells*: Cambridge, Cambridge University Press, p. 3-22.
 111. Suzawa, M, Y Tamura, S Fukumoto, K Miyazono, T Fujita, S Kato, Y Takeuchi, 2002, Stimulation of Smad1 transcriptional activity by Ras-extracellular signal-regulated kinase pathway: a possible mechanism for collagen-dependent osteoblastic differentiation: *J Bone Miner. Res.*, v. 17, p. 240-248.

112. Takahashi,M, T Ishida, O Traub, M A Corson, B C Berk, 1997, Mechanotransduction in endothelial cells: temporal signaling events in response to shear stress: *J Vasc.Res*, v. 34, p. 212-219.
113. Toker,A, 1998, Signaling through protein kinase C: *Front Biosci.*, v. 3:D1134-47, p. D1134-D1147.
114. Traub,O, B P Monia, N M Dean, B C Berk, 1997, PKC-epsilon is required for mechano-sensitive activation of ERK1/2 in endothelial cells: *J.Biol.Chem.*, v. 272, p. 31251-31257.
115. Tsuda,E, M Goto, S Mochizuki, K Yano, F Kobayashi, T Morinaga, K Higashio, 1997, Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis: *Biochem.Biophys.Res Commun.*, v. 234, p. 137-142.
116. Ueland,T, J Bollerslev, L Mosekilde, 2002, [Osteoclast function is regulated by neighbouring osteoblasts. Osteoprotegerin, RAND and RANK ligand constitute a unique regulatory system for bone resorption with important pathophysiological and therapeutic aspects]: *Ugeskr.Laeger*, v. 164, p. 3526-3530.
117. Veltel D., Jones D., 1992, The role of phospholipase C (PI-PLC) in control of osteoblast function, *Aktuelle Aspekte der Osteologie*: Springer Verlag, Berlin, p. 51-54.
118. Vico,L, M H Lafage-Proust, C Alexandre, 1998, Effects of gravitational changes on the bone system in vitro and in vivo: *Bone*, v. 22, p. 95S-100S.
119. Wadhwa,S, S L Godwin, D R Peterson, M A Epstein, L G Raisz, C C Pilbeam, 2002, Fluid flow induction of cyclo-oxygenase 2 gene expression in osteoblasts is dependent on an extracellular signal-regulated kinase signaling pathway: *J Bone Miner.Res*, v. 17, p. 266-274.
120. Wang,XZ, D Ron, 1996, Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase: *Science*, v. 272, p. 1347-1349.
121. Watson,PA, 1991, Function follows form - generation of intracellular signals by cell- deformation: *Faseb Journal*, v. 5, p. 2013-2019.
122. Watson,PA, K E Giger, A M Kempinski, 1995, Type-I and type-VIII adenylyl cyclases constitute a family whose activation is coupled to cellular-deformation through the action of calcium-calmodulin: *Biochemistry And Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire*, v. 73, p. 367-372.
123. Wiesmuller,L, F Wittinghofer, 1994, Signal transduction pathways involving Ras. Mini review: *Cell Signal.*, v. 6, p. 247-267.
124. Wolff,J, 1892, *Das Gesetz der Transformation der Knochen.*: Hirschwald Berlin.
125. Wronski,TJ, E R Morey, 1983, Effect of spaceflight on periosteal bone formation in rats: *Am.J.Physiol.*, v. 244, p. R305-R309.
126. Xiao,G, R Gopalakrishnan, D Jiang, E Reith, M D Benson, R T Franceschi, 2002, Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells: *J Bone Miner.Res*, v. 17, p. 101-110.
127. Yamazaki,T, I Komuro, S Kudoh, Y Zou, I Shiojima, T Mizuno, H Takano, Y Hiroi, K Ueki, K Tobe, ., 1995, Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes: *J Clin.Invest*, v. 96, p. 438-446.

128. You,J, G C Reilly, X Zhen, C E Yellowley, Q Chen, H J Donahue, C R Jacobs, 2001, Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts: J Biol.Chem., v. 276, p. 13365-13371.
129. Zhang,W, J C Lee, S Kumar, M Gowen, 1999, ERK pathway mediates the activation of Cdk2 in IGF-1-induced proliferation of human osteosarcoma MG-63 cells: J Bone Miner.Res, v. 14, p. 528-535.
130. Zhang,X, J Blenis, H C Li, C Schindler, S Chen-Kiang, 1995, Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes: Science, v. 267, p. 1990-1994.

CURRICULUM VITAE

Name:	Jürgen Egid Leitsch
Geburtsdatum:	20. Juni 1969
Geburtsort:	Bad Hersfeld
Familienstand:	ledig
Eltern:	Karl Leitsch, Annette Leitsch
1975:	Ernst-von-Harnack Schule, Bad Hersfeld
1976-1979:	Wilhelm-Neuhaus-Schule, Bad Hersfeld
1979-1981:	Gesamtschule Stadtmitte, Bad Hersfeld
1981-1985:	Konrad-Duden-Schule, Bad Hersfeld
1985-1988:	Modellschule Obersberg, Bad Hersfeld
10.06.1988:	Allgemeine Hochschulreife
1988-1990:	Ausbildung zum Industriekaufmann bei der Siemens AG Deutschland mit Abschluss vor der IHK Nürnberg am 20.09.1090
1990-1991:	Grundwehrdienst
1991:	Beginn der Sanitätsoffizierlaufbahn als Soldat auf Zeit
1993:	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Philipps-Universität in Marburg
März 1995:	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
März 1996:	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
April 1996:	Beginn der Dissertation in der Abt. Experimentelle Orthopädie und Biomechanik der Philipps-Universität Marburg, mit dem Titel: „Die Mitogen Aktivierten Protein – Kinasen ERK1 und ERK2 als Bestandteil der Mechano-transduktion in Primären Bovinen Osteoblasten“ Betreuer: Prof. D.B. Jones
August 1998:	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1998-1999:	Praktisches Jahr an der Philipps-Universität Marburg
Mai 1998:	Posterpräsentation auf der „8th conference of the european orthopardic research society“, Amsterdam, Titel: „Do protein kinases play a role in mechano-transduction in osteoblasts?“
Dezember 1999:	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Dez. 1999-Juni 2001:	Arzt im Praktikum im Bundeswehrzentral-krankenhaus Koblenz auf den Stationen Hämatologie/Onkologie und Innere Intensiv
März 2000:	Ergebnispräsentation auf Osteologiekongreß, Würzburg, Titel: „Mechanische Stimulierung von primären Osteoblasten führt zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 und ist PKC-abhängig
Juni 2001- Okt. 2001:	Weiterbildungsassistent Innere Medizin im Bundeswehrzentralkrankenhaus Koblenz
ab Oktober 2001:	Versetzung zur Luftwaffensanitätsstaffel des Fernmeldebereiches 70 in Trier in Funktion als Truppenarzt, Staffelchef, Standortarzt und Fliegerarzt

Verzeichnis der Akademischen Lehrer

Meine Akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren

Amon	Heß	Maisch
Arnold	Hildebrandt	Mannheim
Aumüller	Hilgermann	Mennel
Basler	Huffmann	Müller
Bauer	Jacob	Netter
Baum	Jones	Neurath
Berger	Joseph	Riedmiller
Friederich	Kaffarnik	Rothmund
Fuhrmann	Karlson	Schäfer
Ganz	Kern	Schachtschabel
Garten	Kienapfel	Schwarz
Gemsa	Kleine	Seifart
Geus	Klose	Slenczka
Gotzen	Knoll	Stempel
Gressner	Kretschmer	Sturm
Griss	Kroll	Thomas
Gröne	Kummer	Voigt
Haberich	Lang	Weber
Happle	Lange	von Wichert
Havemann	Lennarz	Wiegandt
		Zelder

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. D.B. Jones für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit. Er ermöglichte ein selbstständiges und selbstverantwortliches Arbeiten und Forschen und stand stets durch Anregungen, Motivation und durch freundliche Unterstützung bei der Lösung entstandener Probleme fördernd und hilfreich zur Seite. Herrn Dr. Jochen Tenbosch danke ich für die große Hilfsbereitschaft, seinen enormen Einsatz für die Betreuung der Doktoranden und für seine Zuverlässigkeit. Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Jones, insbesondere bei Frau Marita Kratz und Herrn Weng Tan.

Ganz besonderer Dank gilt meinen beiden langjährigen Freunden und Kommilitonen Frau Dr. Susanne Reinartz, geb. Hundt und Herrn Dr. Arndt Guntermann. Ich danke Euch dafür, dass so manche frustrane Phase durch Euch auch im Übel noch etwas Positives bekam. Herzlichen Dank für die hervorragende Zusammenarbeit, für das freundschaftliche Miteinander und das „Füreinander-da-sein“!

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die uneingeschränkte Unterstützung und die große Nachsicht zu jedem Zeitpunkt.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**„Die Mitogen Aktivierten Protein – Kinasen ERK1 und ERK2
als Bestandteil der Mechanotransduktion in primären
Bovinen Osteoblasten“**

im Institut für experimentelle Orthopädie und Biomechanik unter Leitung von Prof. Dr. D.B. Jones mit Unterstützung durch Dr. rer. nat. Jochen Tenbosch ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ochtendung, März 2003